



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
E BIOLOXÍA MOLECULAR  
FACULTADE DE BIOLOXÍA

# **“PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T HUMANOS EN RELACIÓN COA EXPRESIÓN E LOCALIZACIÓN DE CD45RO”**

Tese de doutoramento  
Amparo Pérez Díaz





DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
E BIOLOXÍA MOLECULAR

FACULTADE DE BIOLOXÍA

**Dona Montserrat Nogueira Álvarez e Don Francisco Javier Salgado Castro**, profesora titular e profesor contratado doutor do Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular da Universidade de Santiago de Compostela

INFORMAN:

Que a presente memoria titulada **“PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T HUMANOS EN RELACIÓN COA EXPRESIÓN E LOCALIZACIÓN DE CD45RO”**, presentada por **Amparo Pérez Díaz** para optar ó Grao de Doutora en Bioloxía, foi realizada baixo a súa dirección no Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular da Universidade de Santiago de Compostela e reúne os requisitos para ser valorada polo tribunal correspondente.

E para que conste ós efectos oportunos, asinan o presente informe a 28 de xuño de 2010.

Dra. Montserrat Nogueira Álvarez

Dr. Francisco J. Salgado Castro

Asdo. Amparo Pérez Díaz





## ***AGRADECEMENTOS***

Só cando se ve a luz ó final do camiño pode permitirse unha a licencia narrativa? que supón escribir estas páxinas de agradecemento, que paradoxicamente serán as primeiras (e en moitos casos, as únicas) que se lean deste traballo.

Agradecer en primeiro lugar ós meus directores de tese, Montse e Fran, o terme dado a oportunidade de aprender o que é en realidade a investigación, con todo o que conleva, non só o traballo no laboratorio, senón tamén a xestión, a responsabilidade, a paciencia, o espírito crítico e sempre positivo e a capacidade de recuperarse dun mal resultado con máis ganas para seguir adiante. A Pilar, por reforzar as miñas facetas de traductora/lingüista/informática.

Se por algo nos chamamos Grupo de Bioloxía do Linfocito é porque somos un EQUIPO que formamos todas/os os que estiveron e as/os que están. Moitas gracias a AnaCanda, por ensinarme de todo desde o principio e por seguir aí, Mar Cantábrico de por medio, e por todo o coñecemento (chámalle JI) que nos proporciona o MRS. A Moni, que acabará poñendo unha cama no lab, aínda que logo non a atope mentras siga preguntando posibles cousas que poden pasar no lab; a Rosi cos seus consellos (ó principio ignorados por min, como somos!) sempre útiles desde calquera dos personaxes do mundo piruleta; a Jenni, compañeira cando só había un laboratorio baleiro e un portátil; a Nori, Álex e Ana polo traballo regulador en equipo, (VIVA, VIVA!). Gracias a toda a xente que pasou polos laboratorios veciños a este e que sufriron cortes de luz, traslados e peticións de todo tipo de reactivos e instrumentos, e moi especialmente a Josiño, un máis do equipo, un fen-ómeno da proteómica e de todo o que se propón, por tantos temazos, frikadas, consellos, ánimos, solucións e momentazos compartidos.

Se cheguei aquí é porque hai xente que veu comigo desde que un día nos presentamos na facultade ou que foron chegando polo camiño, sobre todo Eva, Ana e Rebe, que comparten comigo unha profesión e tamén un modo de vida no que o concepto “*ultralight*” ás veces é máis importante que moitas outras cousas.

Gracias a todos os meus amigos e amigas de Lourenzá, por estar sempre aí, e porque moitas veces sen sabelo (Pabliño, Raúl: gracias) foron o apoio máis grande. Poido afirmar (e non me equivoco) que un chiste malo, unha cea dos 3000/Vilar/chiringo ou unha viaxe “aí a un sitio” son a mellor terapia que existe. “*Pequeñas tretas para continuar en la brecha*”.

Os/as que me coñecen saben que a miña segunda casa é Cantigas e Agarimos. Gracias a toda a súa xente, por traballar na conservación do que é noso: unha historia que ten que ser coñecida para poder ser valorada e así non ser esquecida. En especial a Pedro, Eibi, Petru e Charan polos momentos compartidos que nos unen aínda que nos separen océanos. “*Siempre somos y seremos*”.

Durante estes anos funme cruzando con moita outra xente, que non podería enumerar porque sería eternizarme, pero ós/ás que é imprescindible agradecer todo o vivido con eles e elas e que foi a desconexión desta tese: as músicas, as clases, os darnocravos e trivials, as foliadas, os eventos falsos e tamén os verdadeiros, os cafés, os días e as noites.

Hai detalles técnicos que parecen tonterías pero sen os que custaría moito máis rematar este traballo: o illamento facilitado polos auriculares *noise-isolation* (que gran invento!), a música adecuada para cada momento proporcionada por Spotify que axudou a calmar tantos ánimos ou a levantalos cando foi preciso ou os amigos informáticos que tantos problemas solucionaron. De entre estes últimos, un agradecemento moi especial para Reyva(j) polas inspiradas ideas e a paciencia.

As últimas palabras son as que quedan resoando na cabeza, e teñen que ser para a familia, os que están desde o principio ata o final, sempre con infinita paciencia e os responsables de que este traballo teña sentido. Mamá, papá, Jesu: o agradecemento debido non cabería en tódalas páxinas que poida eu escribir. GRACIAS.



## **Abreviaturas**

## **Introducción** **1**

<b>1. O SISTEMA INMUNE .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 INMUNIDADE INNATA.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. <u>Compoñentes celulares</u> .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. <u>Factores solubles</u>.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 INMUNIDADE ADQUIRIDA.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1. <u>Inmunidade específica humoral</u>.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2. <u>Inmunidade específica celular</u>.....</b>	<b>4</b>
<b>2. SINALIZACIÓN CELULAR .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 CITOQUINAS .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 RECEPTORES DE CITOQUINAS .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3 MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SINAL .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 O TCR E A RESPOSTA INMUNE.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5 RAFTS LIPÍDICOS E SINALIZACIÓN CELULAR.....</b>	<b>16</b>
<b>2.6 SINALIZACIÓN INTRACELULAR.....</b>	<b>20</b>
<b>3. RESPOSTAS INMUNES MEDIADAS POR CÉLULAS TH ..</b>	<b>22</b>
<b>3.1 AS RESPOSTAS TH1 E TH2.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 A RESPOSTA TH17 .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3 OUTROS SUBTIPOS DE LINFOCITOS T CD4*.....</b>	<b>28</b>
<b>4. CÉLULAS REGULADORAS.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 ORIXE E FUNCIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....</b>	<b>32</b>

5.	A INTERLEUQUINA 12 .....	35
5.1	A MOLÉCULA E O RECEPTOR.....	35
5.2	REGULACIÓN DA PRODUCCIÓN DE IL-12.....	36
5.3	TRANSDUCCIÓN DO SINAL DA IL-12 .....	38
5.4	FUNCIÓNS BIOLÓXICAS .....	40
5.4.1	<u>IL-12 e proliferación celular</u> .....	40
5.4.2	<u>IL-12 e produción de IFN-<math>\gamma</math> e outras citocinas</u> ...	42
5.4.3	<u>Efectos citotóxicos da IL-12.</u> .....	44
5.5	IL-12 E A RESPOSTA TH1.....	44
5.5.1	<u>IL-12 e resistencia a infeccións e tumores</u> .....	45
5.6	OUTROS MEMBROS DA FAMILIA IL-12.....	47
5.6.1	<u>IFN-<math>\gamma</math></u> .....	48
6.	CD26 .....	48
6.1.	EXPRESIÓN DE CD26.....	49
6.2.	FUNCIÓNS.....	50
6.2.1	<u>Actividade enzimática</u> .....	50
6.2.2	<u>Asociación coa matriz extracelular</u> .....	51
6.2.3	<u>Interacción CD26-ADA</u> .....	51
6.2.4	<u>Interacción célula-célula e transducción de sinais: caveolina 1, CARMA-1 e CD45RO</u> .....	53
7.	CD45 .....	56
7.1	ISOFORMAS.....	56
7.2	FUNCIÓNS DE CD45 .....	59
7.2.1	<u>Transducción de sinal</u> .....	60
7.2.2	<u>Control da actividade enzimática</u> .....	61

7.3 LOCALIZACIÓN .....	62
------------------------	----

## **Obxectivos** **65**

## **Material e Métodos** **69**

1. EXTRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO .....	71
2. CULTIVO CELULAR .....	73
3. CITOMETRÍA DE FLUXO .....	74
3.1 MARCAXE EXTRACELULAR E INTRACELULAR .....	76
3.2 ANÁLISE DA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	79
4. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	80
5. SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA.....	81
6. SEPARACIÓN DE DOMINIOS DE MEMBRANA PLASMÁTICA MEDIANTE GRADIENTES DE SACAROSA .....	82
7. MEDIDA DA ACTIVIDADE FOSFATASA ALCALINA .....	83
8. WESTERN BLOT .....	83
9. SILENCIAMIENTO DO XEN DE CD26 MEDIANTE SIRNAS	84
9.1 ANTECEDENTES.....	84
9.2 SISTEMAS RETROVIRAIS.....	86
9.3 ACCELL SIRNA .....	89
10. MEDIDA DE PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE BRDU.....	91
11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	92

## **Resultados e discusión** **93**

1. OPTIMIZACIÓN DO SISTEMA DE TRABAJO.....	95
2. INTERACCIÓN ENTRE CD26 E CD45RO. EFECTO DE CITOQUINAS .....	97
3. LOCALIZACIÓN DE CD45RO NA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	109
4. PROLIFERACIÓN CELULAR: IL-12 E ADA.....	117
<i>4.1 RELACIÓN ENTRE PHA E O EFECTO PROLIFERADOR DE ADA</i> .....	<i>122</i>
5. EFECTO DE ADA ESÓXENA SOBRE A EXPRESIÓN DE CD45RO .....	123
<i>5.1 ESTUDO CINÉTICO DA EXPRESIÓN DE CD45RO E CD26 MEDIADA POR IL-12</i> .....	<i>132</i>
6. SIRNA.....	143
7. NTREGS .....	154

## **Conclusiones** **171**

## **Bibliografía** **175**



# Abreviaturas





Aa	Aminoácido	
Ab	Anticorpo	<i>Antibody</i>
ADA	Adenosina desaminasa	<i>Adenosine deaminase</i>
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	<i>Ciclic adenosine monophosphate</i>
AP	Fosfatasa alcalina	<i>Alkaline Phosphatase</i>
APC	Célula presentadora de antígeno	<i>Antigen Presenting Cell</i>
APC (fluorocromo)	Aloficocianina	<i>Allophycocyanin</i>
BrdU	Bromodeoxiuridina	<i>Bromodeoxyuridine</i>
BSA	Seroalbúmina bovina	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CARMA-1		<i>Caspase recruitment domain-containing membrane associated guanylate kinase protein-1</i>
CCL	Ligando de quimioquina C-C	<i>C-C Chemokine Ligand</i>
CCR	Receptor de quimioquina C-C	<i>C-C Chemokine Receptor</i>
CD	Antígeno perteneciente ó grupo de diferenciación de linfocitos	<i>Cluster of Differentiation Antigen</i>
Células NK	Células asesinas naturais	<i>Natural Killer Cells</i>
CFSE	Succinimidil éster de carboxifluoresceín diacetato	<i>5 (6)- Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester</i>

CRAC	Canal de $\text{Ca}^{2+}$ activado pola liberación de $\text{Ca}^{2+}$	<i><math>\text{Ca}^{2+}</math> release-activated <math>\text{Ca}^{2+}</math> channel</i>
CTB	Subunidade B da toxina colérica	<i>Cholera Toxin <math>\beta</math> subunit</i>
CTL	Linfocito T citotóxico	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
CTLA-4	Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
CXCL12	Ligando de quimioquina 12 (motivo C-X-C)	<i>Chemokine C-X-C Motif ligand 12</i>
DAG	Diácilglicerol	<i>Diacylglycerol</i>
DCs	Células dendríticas	<i>Dendritic Cells</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DpA	Diprotina A	<i>Diprotin A</i>
DPPIV	Dipeptidil peptidasa IV	<i>Dipeptidyl Peptidase IV</i>
dsRNA	ARN de dobre cadea	<i>Double stranded RNA</i>
EGFR	Receptor do factor de crecemento epidérmico	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERK	Quinasa regulada extracelularmente	<i>Extracellular Regulated Kinase</i>
FBS	Suero bovino fetal	<i>Foetal Bovine Serum</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>

FRET	Transferencia de enerxía resonante de fluorescencia	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
FSC	Canle de dispersión frontal	<i>Forward Scatter Channel</i>
Fyn	Proteína oncoxénica Fyn	<i>FYN oncogene Related to Src</i>
GAM	Anticorpo anti-rato desenvolvido en cabra	<i>Goat Anti Mouse Immunoglobulin</i>
GITR	Receptor de TNF inducido por glucocorticoides	<i>Glucocorticoid-Induced TNF Receptor</i>
GLP-1	Péptido similar a glucagón	<i>Glucagon-like peptide</i>
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GM1	Gangliósido de membrana	<i>Monosialotetrahexosylganglioside</i>
GPI	Glucofosfatidil inositol	<i>Glycophosphatidylinositol</i>
GTPasa	Guanosina trifosfatasa	<i>Guanosine Triphosphatase</i>
HLA	Antígenos humanos leucocitarios	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
IFN- $\gamma$	Interferón $\gamma$	<i>Gamma Interferon</i>
Ig	Inmunoglobulina	<i>Immunoglobulin</i>
IL	Interleuquina	<i>Interleukin</i>
IL-12R	Receptor de IL-12	<i>IL-12 Receptor</i>

IMF	Intensidad media de fluorescencia	
ITAM	Motivo de activación inducible por tirosina	<i>Inducible Tyrosine Activation Motif</i>
JAK	Quinasa Janus	<i>Janus Kinase</i>
JNK	Quinasas con dominio terminal tipo c-Jun	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
kDa	Kilodalton	<i>Kilodalton</i>
LAK	Células asesinas activadas por linfoquinas	<i>Lymphokine Activated Killer cells</i>
LAT	Adaptador transmembrana de activación de células T	<i>Linker for Activation of T cells</i>
LCA	Antígeno común leucocitario	<i>Leukocyte Common Antigen</i>
Lck	Tirosín proteín quinasa específica de linfocitos	<i>Lymphocyte Specific Protein Tyrosin Kinase</i>
LPAP	Fosfoproteína de linfocitos asociada a fosfatasa	<i>Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein</i>
LPS	Lipopolisacárido	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAPK	Proteín quinasa activada por mitógeno	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
M $\beta$ CD	Metil $\beta$ ciclodextrina	<i>Methyl-beta-cyclodextrin</i>
MC	Medio de cultivo completo	

MEK	Quinasa regulada por sinais extracelulares e mitóxenos	<i>Mitogen-activated/extracellular-signal regulated protein Kinase</i>
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensaxeiro	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NF-κB	Factor nuclear activador de células B de cadea kappa lixeira	<i>Nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells</i>
NOS	Sintasa de óxido nítrico	<i>Nitric oxide synthase</i>
PBMCs	Células mononucleares de sangue periférico	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Tampón fosfato salino	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PE	Ficoeritrina	<i>Phycoerythrin</i>
PFA	Paraformaldehido	<i>Paraformaldehyde</i>
PHA	Fitohemaglutinina	<i>Phytohemagglutinin</i>
PI3	Fosfoinosítido 3-quinasa	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PKC	Proteína quinasa C	<i>Protein Kinase C</i>
PMSF		<i>Phenylmethanesulfonylfluoride</i>
Pro	Prolina	<i>Proline</i>
PTGS	Silenciamento xénico post-transcricional	<i>Post Transcriptional Gene Silencing</i>

PTK	Proteína tirosín quinasa	<i>Protein Tyrosine.Kinase</i>
PTP	Proteína tirosín fosfatasa	<i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>
RANTES	Quimioquina secretada e expresada por células T regulada por activación	<i>Regulated-upon-Activation Normal T Expressed and Secreted chemokine</i>
RE	Retículo Endoplasmático	
RT	Temperatura ambiente	<i>Room Temperature</i>
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SFKs	Quinasas da familia Src	<i>Src Family Kinases</i>
SH2	Dominio con homoloxía a SRC-2	<i>Src Homology 2 Domain</i>
siRNA	RNA interferente pequeno	<i>Small interfering RNA</i>
SOCS	Supresores da sinalización por citoquinas	<i>Suppressors of cytokine signalling</i>
SSC	Canle de dispersión lateral	<i>Side Scatter Channel</i>
STAT	Transductor de sinal e activador de transcripción	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Tc	Linfocito T citotóxico	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
TCR	Receptor das células T	<i>T cell Receptor</i>



TGF- $\beta$	Factor transformante do crescimento $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
Th	Linfócito T colaborador	<i>Helper T cell</i>
TLR	Receptores tipo Toll	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- $\alpha$	Factor de necrose tumoral $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>
Treg	Célula T reguladora	<i>Regulatory T cell</i>
TRITC	Tetrametil rodamina isotiocianato	<i>Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate</i>
Tyr	Tirosina	<i>Tyrosine</i>
TX100	Tritón-X-100	
VIH	Virus da imunodeficiência humana	
ZAP-70	Proteína quinasa de 70 kDa associada a cadeia zeta	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>



# Introducción





## **1. O SISTEMA INMUNE**

Os organismos desenvólvense en ambientes nos que establecen numerosas interaccións entre si mesmos e os diferentes compoñentes que os rodean. Este feito crea a necesidade de distinguir o que é propio do que é alleo, coa fin de evitar a falta de recoñecemento a partículas extrañas (tolerancia) ou a reacción contra as estruturas propias (autoinmunidade). Estes mecanismos protectores constitúen o sistema inmune, un conxunto de estruturas biolóxicas e mecanismos asociados para a defensa do organismo, que teñen unha base xenética pero que son moi modificables, sendo capaces de adaptarse ó entorno ó que está exposto o individuo.

Este sistema de defensa consta de barreiras físicas (a pel, as mucosas, etc.), químicas (barreiras de pH, de temperatura, etc.) e fisiolóxicas (substancias antimicrobianas do propio organismo, flora microbiana, etc.). Unha vez que se atravesan estas barreiras, empeza a funcionar o sistema inmune propiamente dito.

Existen dous tipos de resposta inmune que se diferencian polo momento e o modo en que recoñecen e combaten unha infección.

### **1.1 INMUNIDADE INNATA**

A primeira resposta dun organismo fronte ós patóxenos é a reacción inflamatoria, caracterizada pola migración dos tipos celulares con funcións defensivas, alteracións na permeabilidade vascular e secreción de mediadores solubles como as citoquinas, as quimioquinas e os interferóns (IFN). As células inflamatorias e os mediadores solubles teñen unha potente actividade antimicrobiana e xuntos constitúen a fase efectora da resistencia innata.

Trátase dunha resposta inespecífica presente en case tódalas formas de vida. A exposición a un antíxeno leva a unha resposta máxima inmediata da que non queda memoria inmunolóxica. Consta de varios

compoñentes celulares e humerais existentes antes de que se desenvolva a infección (Medzhitov & Janeway, 1997). Estes mecanismos responden de forma rápida ós patóxenos e funcionan por diversos mecanismos, como a endocitose, a fagocitos, a lise mediada por produtos citotóxicos, etc.

### **1.1.1. Compoñentes celulares**

- fagocitos: un tipo de glóbulos brancos que poden ser polimorfonucleares, monocitos (que se diferencian en macrófagos nos tecidos), células dendríticas, etc. Actúan destruindo os microorganismos por fagocitose, e poden atravesar superficies epiteliais (Aderem & Underhill, 1999).
- células asesinas naturais (NK, de *natural killer*). Son tamén leucocitos que se activan por interferóns producidos como resposta a infeccións virais. Recoñecen e lisan as células afectadas (Middleton *et al.*, 2002).

O recoñecemento dos patóxenos polos macrófagos e outras células da resposta innata está mediado por un grupo de receptores que se denominan receptores de recoñecemento de patrón (PRRs, *Pattern-recognition receptors*), que recoñecen patróns moleculares conservados presentes nos patóxenos, o que lles permite poñer en marcha un sistema rápido de defensa carente de memoria. Inclúense nesta categoría os receptores endocíticos que median a fagocitose e os receptores activadores que inducen a produción de citoquinas, entre eles o receptor de LPS (CD14) e os receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR), presentes na membrana de células da resposta innata e que participan na eliminación de microorganismos. A súa activación estimula a produción de citoquinas, de moléculas coestimuladoras e a síntese de péptidos antimicrobianos (Imler & Hoffmann, 2001).

### **1.1.2. Factores solubles**

- citoquinas: proteínas que regulan e coordinan moitas das funcións das células que interveñen na inmunidade celular. Son responsables da comunicación intercelular e están producidas principalmente por linfocitos e macrófagos activados.
- sistema do complemento: conxunto de proteínas plasmáticas que actúan conxuntamente con outros compoñentes do sistema inmune, orixinando a reacción de inflamación aguda. (Ravetch & Clynes, 1998).
- proteínas de fase aguda: nun proceso inflamatorio, certas citoquinas como a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  son as responsables da elevación dos niveis deste tipo de proteínas producidas polo fígado (como a proteína C reactiva, proteínas da coagulación ou proteínas transportadoras) que se concentran na zona afectada, favorecendo a activación do complemento polas dúas vías principais (clásica e alternativa) (Baumann & Gauldie, 1994).

## **1.2 INMUNIDADE ADQUIRIDA**

Ás veces os mecanismos da inmunidade innata inespecífica non son suficientes para deter o avance da agresión. Por iso, en vertebrados superiores e especialmente en mamíferos existe unha segunda liña de defensa que se se denomina inmunidade adquirida ou adaptativa, moito máis flexible e específica fronte á agresión. O seu funcionamento está baseado en anticorpos e no receptor da célula T (TCR), que son capaces de recoñecer as moléculas alleas ó propio organismo. Neste tipo de resposta existe un período de tempo entre a exposición ó antígeno e a resposta máxima, e queda memoria inmunolóxica dela, o que permite que a seguinte vez que o organismo

entre en contacto co mesmo antíxeno, a resposta sexa máis rápida, eficaz e duradeira (Pancer & Cooper, 2006).

As respostas innata e adaptativa non son totalmente independentes: actúan en conxunto e colaborando entre si. O factor crítico para o funcionamento da resposta inmune adquirida é o recoñecemento específico do antíxeno, ben en forma soluble, no que participan anticorpos, (moi efectivos fronte a patóxenos extracelulares ou toxinas presentes no medio externo), ben polo TCR cando o antíxeno está asociado ó complexo maior de histocompatibilidade (MHC) tras o seu procesado por parte dunha célula presentadora de antíxeno (máis eficaces á hora de detectar parásitos intracelulares, virus ou células cancerosas).

Dentro da inmunidade adquirida poden xerarse dous tipos de respostas:

### **1.2.1. Inmunidade específica humoral**

Depende da acción dos anticorpos que é capaz de xerar o organismo fronte ós antíxenos extraños. Son producidos polas células B por un proceso denominado selección e expansión clonal, que ten lugar unha vez que o linfocito B se atopa co antíxeno. Ó remate deste proceso, parte das células B xeradas convertíranse en células plasmáticas e outras en linfocitos de memoria, sendo estas últimas capaces de provocar unha segunda resposta máis rápida e efectiva fronte ó antíxeno que recoñecen.

### **1.2.2. Inmunidade específica celular**

A inmunidade humoral non é moi efectiva fronte a patóxenos intracelulares. Por iso, os linfocitos T, principais compoñentes da inmunidade específica celular, recoñecen especificamente os antíxenos extraños na superficie das células propias cando están asociados ó MHC. O responsable deste recoñecemento é o TCR, dependendo o tipo



de resposta da célula que presenta o antígeno asociado ó MHC e do tipo de linfocito T implicado.

Os linfocitos T supoñen o 70% do total dos linfocitos (Abbas *et al.*, 1996). Os diferentes subtipos de linfocitos desenvolven funcións variadas:

- Linfocitos T efectores:
  - Linfocitos T citotóxicos  $CD8^+$  ( $T_c$ ), que detectan antígenos asociados ó MHC de tipo I e que eliminan por medio de enzimas citotóxicas. Son capaces de introducirse directamente nas células infectadas que recoñecen, provocando a súa entrada en apoptose (mediada pola interacción entre a proteína Fas -Apo1 ou CD95- e o seu ligando). Son tamén produtores de  $IFN-\gamma$ , xunto coas células NK e outros tipos celulares (Andersen *et al.*, 2006).
  - Linfocitos T colaboradores  $CD4^+$  ( $T_h$ ), que recoñecen antígenos asociados a moléculas MHC de tipo II nas células fagocitarias e presentadoras de antígenos (APCs: macrófagos, células dendríticas, etc.), iniciando a cascada de resposta inmune. Son capaces de amplificar, coordinar e regular os compoñentes do sistema inmune.
- Linfocitos T de memoria: son células que se xeneran logo da activación dos linfocitos T por exposición a un antígeno. Teñen vida larga e especificidade polo antígeno fronte ó cal se xeneraron. Teñen un fenotipo bastante heteroxéneo e poden ser  $CD4^+$  ou  $CD8^+$ . Soen expresar en altos niveis moléculas de adhesión e tamén CD62, CCR7 e sobre todo, CD45RO. Fálase de 2 subgrupos: de memoria efectora e de memoria central (Sprent, 1994).

- Linfocitos T reguladores (Treg): suprimen a resposta inmunolóxica. As súas características e funcións serán tratadas no apartado 4.

A inmunidade innata é eficaz para previr unha infección ou reducir en boa parte a carga dun patóxeno, pero o control da infección só se acada realmente cando se activa a inmunidade adaptativa. Pero debido á necesidade de expansión clonal das células T e B, unha resposta adaptativa eficaz tarda polo menos unha semana desde que ocorre a infección primaria. A inmunidade innata e a adaptativa non son simplemente mecanismos complementarios de resistencia a patóxenos, senón que se regulan un a outro, a través de contactos celulares e de secreción de mediadores solubles. Existen dous vínculos importantes entre a inmunidade innata e a adaptativa. En primeiro lugar, as respostas innatas estimulan o desenvolvemento de respostas adaptativas e inflúen na natureza destas últimas. Por outra parte, as respostas inmunitarias adaptativas utilizan moitos dos mecanismos efectores da inmunidade innata para eliminar microorganismos e moitas veces potencian a actividade antimicrobiana dos mecanismos de defensa da inmunidade innata.

## **2. SINALIZACIÓN CELULAR**

A célula precisa relacionarse co entorno ó seu redor, recibir e procesar información do exterior e emitir os seus propios sinais para que sexan interpretados por outras células. Nestes procesos de sinalización a membrana plasmática é clave, xa que nela se reciben os estímulos que a continuación son transformados en sinais recoñecibles polo interior celular, e que, en última instancia desembocan nas adaptacións necesarias para sobrevivir nas novas condicións. Os sinais poden ser de tipo eléctrico ou ben ser moléculas hidrófobas (pasan libremente a través da membrana) ou hidrófilas (non poden atravesar a membrana e necesitan a presenza dun receptor).

Unha característica común a todos os organismos é a capacidade de coordinar constantemente as súas actividades cos cambios no ambiente que os rodea. A comunicación co medio lévase a cabo a través de vías que reciben e procesan os sinais orixinados no medio externo ou por outras células do organismo ou por outras rexións da célula. A base para a coordinación das funcións fisiolóxicas nun organismo multicelular é a sinalización intercelular, que permite que unha única célula inflúa no comportamento doutras de forma específica.

Os sinais xerados durante a comunicación intercelular son recibidos e procesados nas células diana onde desencadean as reaccións bioquímicas intracelulares que están detrás dos procesos fisiolóxicos do organismo. No procesamento do sinal hai varios pasos que conforman as vías de sinalización intracelular. A transducción de sinal na célula diana debe estar coordinada e axustada nunha rede de vías de sinalización intracelular que ó final desencadean procesos bioquímicos que determinan as funcións específicas da célula. Ambos procesos (a sinalización intracelular e extracelular) están reguladas por mecanismos que permiten a coordinación das funcións celulares de forma específica.

### ***2.1 CITOQUINAS***

As citoquinas son polipéptidos de baixo peso molecular que se producen en resposta a microorganismos e outros antíxenos que median e regulan as reaccións inmunitarias e inflamatorias. O termo interleuquina (IL) aplicouse en concreto a aquelas moléculas que servían como sinais de comunicación entre distintos tipos de leucocitos.

En xeral, as citoquinas da inmunidade innata e adaptativa son producidas por poboacións celulares diferentes, principalmente linfocitos e macrófagos activados, pero tamén por leucocitos polimorfonucleares, células endoteliais, epiteliais ou do tecido conxuntivo. Son capaces de

## 1. Introducción

---

actuar sobre células diana distintas, pero pode haber algunhas accións que se superpoñan.

A expresión da maioría das citoquinas está estritamente regulada, non detectándose unha expresión constitutiva e sendo necesaria a activación celular para que se produzan citoquinas en cantidade suficiente para exercer os seus efectos biolóxicos. A maioría son secretadas ó espazo extracelular, moitas delas en forma glicosilada, o que incrementa a súa estabilidade e solubilidade, pero tamén poden acumularse no interior celular ou quedar ancladas na membrana ou na matriz extracelular. Son moléculas cunha vida media moi curta e actúan a concentracións moi baixas, mediante a unión a receptores de alta afinidade presentes na superficie celular.

Algunhas das principais propiedades das citoquinas son a secreción breve (as citoquinas son inestables porque os seus mRNA tamén o son) e autolimitada; a acción pleiotrópica e redundante, xa que actúan sobre diferentes tipos celulares e median distintos efectos biolóxicos, podendo ter varias citoquinas os mesmos efectos funcionais. Ademais, inflúen na síntese e acción doutras citoquinas e necesitan unirse a un receptor específico de membrana para iniciar a súa acción. A expresión destes receptores está regulada por diversos sinais externos, o que condiciona a resposta das células ás citoquinas.

En base ás súas moi variadas accións biolóxicas, clasifícanse as citoquinas en 3 categorías funcionais:

- Mediadores e reguladores da inmunidade innata. Producidas principalmente por monocitos e macrófagos, pero tamén por outros tipos celulares. Estimulan as reaccións infecciosas temperás. Neste grupo inclúense a IL-1, IL-6, os TNF, a IL-10, a IL-12, a IL-18 e os IFN  $\alpha$  e  $\beta$ .

- Mediadores e reguladores da inmunidade adaptativa. Producidas polos linfocitos T en resposta ó recoñecemento específico de antíxenos extraños. Regulan o crecemento e diferenciación das poboacións de

linfocitos, polo que desenvolven importantes papeis na activación das respostas inmunitarias dependentes das células T. Poden agruparse aquí a IL-2, IL-15, IFN- $\gamma$ , IL-4 e TGF entre outros.

-Estimuladores da hematopoiese, producidas polo estroma da médula ósea, leucocitos e outras células, que promoven e estimulan o crecemento e diferenciación das células sanguíneas maduras a partir de células nai hematopoiéticas. Ás veces denomínanse xenericamente factores estimuladores da formación de colonias (CSF). Inclúen, por exemplo a IL-3, IL-5, IL-7 e GM-CSF.

### **2.2 RECEPTORES DE CITOQUINAS**

Tódolos receptores de citoquinas constan dunha ou máis proteínas transmembrana con porcións extracelulares (que son as responsables da unión á citoquina) e citoplasmáticas, que inician as vías de sinalización intracelular (Gehr *et al.*, 1992). Estas vías de sinalización soen activarse polo agrupamento de receptores inducido polo ligando, polo que se agrupan as porcións citoplasmáticas de dúas ou máis moléculas receptoras nun proceso similar á sinalización polos receptores das células T e B para os antíxenos (Miyajima *et al.*, 1992). A clasificación dos receptores baséase en semellanzas estruturais nos dominios extracelulares de unión a citoquinas

-receptores de citoquinas de tipo I (receptores de hematopoietinas) Conteñen motivos conservados en ambos extremos da súa rexión extracelular. Soen ser complexos multicatenarios que teñen unha ou máis cadeas específicas de unión ó ligando e comparten unha mesma cadea que intervéen na transducción de sinais ó interior da célula. Nesta familia inclúense as cadeas de transducción  $\beta$  do IL-2R, e a cadea específica dos receptores da IL-3, IL-4, IL-5 e EPO entre moitas outras (Boulay & Paul, 1992).

-receptores de citocinas de tipo II. Estes receptores teñen conservado no extremo N-terminal da súa rexión extracelular un par de residuos de cisteína pero non teñen o motivo C-terminal que presentan os receptores de tipo I. Nesta clase inclúense os receptores dos IFNs e o IL-10R (Pestka *et al.*, 2004).

-Superfamilia das Igs. A esta familia pertencen un grupo de receptores que presentan na rexión extracelular un número variable de dominios similares ós das Igs e que interveñen na unión co ligando, provocando a transmisión do sinal cara o interior da célula gracias ás secuencias tirosín quinasa presentes nestes dominios. A esta familia pertencen os receptores da IL-1 (Boraschi & Tagliabue, 2006) e doutras citocinas implicadas no crecemento celular (factor estimulante de colonias de macrófagos ou M-CSFR, o factor de crecemento derivado de plaquetas ou PDGFR, etc.).

-receptores do TNF. A súa característica principal é a presenza dun dominio extracelular de 3-4 secuencias conservadas de aproximadamente 40 aminoácidos, ricas en cisteína e implicadas na unión ó ligando (Gruss & Dower, 1995). Inclúense neste grupo o receptor do factor de crecemento nervioso (NGFR) e os 3 tipos de receptores para o TNF $\alpha$  e as linfoquinas (LT) (TNFR1, TNFR2 y TNFR3). Ademais, a esta familia de receptores pertencen outras proteínas de membrana como o CD27, CD30, CD40, Fas-APO1 e APO-2L (Wallach *et al.*, 1999).

-receptores de 7 hélices transmembrana ou receptores de quimioquinas. As quimioquinas (Baggiolini, 1998) son un tipo de citocinas similares estruturalmente e que se caracterizan por ter unha actividade quimiotáctica e estimuladora sobre as células de tipo inflamatorio. Divídense en 2 clases, CC e CXC, según variacións nun motivo de cisteínas que se atopa conservado en tódolos receptores da familia. Os receptores ós que se unen estas quimioquinas presentan unha rexión extracelular corta e unha rexión con 7 segmentos

transmembrana moi conservados e están asociados a proteína G, que intervén na transducción do sinal. Nesta familia distínguense os receptores específicos e os compartidos segundo a súa especificidade de unión co ligando. Os específicos unen un ligando en concreto, o exemplo máis representativo é o IL-8RA ou CXCR. Pola contra, os receptores compartidos poden unir máis dunha quimioquina, como é o caso do IL-8RB ou CXCR2.

### **2.3 MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SINAL**

A unión dunha citoquina ó seu receptor na superficie da célula diana provoca o seu efecto biolóxico mediante a fosforilación de proteínas celulares (incluído o propio receptor). Estas proteínas fosforiladas activan factores de transcripción producíndose en último termo a transcripción de determinados xenes cuos produtos serán os efectores do efecto biolóxico correspondente. Na maioría dos receptores, o primeiro paso da sinalización consiste na oligomerización de varias cadeas de receptores inducida pola unión co ligando. Esta asociación permite o contacto das rexións citoplasmáticas dos receptores, que desencadean os mecanismos de sinalización específicos de cada familia de receptores.

Na superfamilia das inmunoglobulinas, a sinalización está mediada por receptores con actividade tirosín quinasa na súa rexión citoplasmática, previa oligomerización de varias cadeas do receptor. No caso da familia do receptor do TNF participan un tipo de proteínas citoplasmáticas denominadas factores asociados ó receptor do TNF (TRAF) que forman complexos que interaccionan coas rexións citoplasmáticas dos receptores, producindo en último término a activación do factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Dempsey *et al.*, 2003). Na familia dos receptores de quimioquinas a sinalización está mediada por proteínas G asociadas ó seu extremo carboxiterminal. Estas proteínas están na cara interna da membrana citoplasmática e catalizan o

intercambio de GDP por GTP, producindo a activación de moitos enzimas citoplasmáticos e, por conseguinte, a activación de factores de transcrición (Neel *et al.*, 2005), sen que sexa necesaria a oligomerización do receptor para a transducción de sinais, xa que os receptores constan unicamente dunha cadea.

No caso que máis nos interesa, o dos receptores de citoquinas, a sinalización ten lugar pola vía Jak-STAT (Kotenko & Pestka, 2000; O'Shea & Murray, 2008). Estes receptores non teñen dominios con actividade catalítica na súa rexión citoplasmática, pero aínda así a unión da citoquina co receptor provoca unha rápida fosforilación de tirosinas en proteínas celulares, incluído o propio receptor.

Esta sinalización está mediada principalmente pola familia de tirosín quinasas denominadas Janus quinasas (JAKs) e por factores de transcrición da familia denominada STAT (*signal transducers and activators of transcription*) (Leonard & O'Shea, 1998). Non se coñece aínda o mecanismo exacto polo que se produce a sinalización por esta vía, pero pénsase que as JAKs están asociadas a algunha das subunidades do receptor e que a oligomerización deste inducida pola unión coa citoquina produce a activación da quinasa por autofosforilación. A continuación, as JAKs activadas fosforilan residuos de tirosina no propio receptor así como nos factores de transcrición STAT. O seguinte paso na sinalización consiste na dimerización das STAT fosforiladas e na súa translocación ó núcleo onde se unen a secuencias palindrómicas do DNA.

A familia de quinasas JAK consta actualmente de 4 membros (Jak1, Jak2, Jak3 e Tyk2). No tocante á familia STAT, identificáronse 7 membros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6), sen que pareza existir un patrón específico que relacione a activación do receptor cun STAT: un STAT pode ser activado por múltiples receptores e a unión dunha citoquina co seu receptor pode activar varios STATs.



Outra vía de sinalización utilizada polos receptores de citocinas é a de Ras/MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) que, ademais, forma parte do crecemento normal en resposta a moitos factores de crecemento e da proliferación inducida por oncoxenes. A estimulación desta vía aumenta a cantidade da proteína Ras, con actividade GTPasa, activando a cascada de quinasas MAPKKK (MAPK quinasa de quinasa de quinasas, como Raf), que á súa vez activan ás MAPKK (tamén coñecidas como MEK (MAP/ERK quinasas) e por último ás MAPK, que se translocan ó núcleo, onde fosforilan varios factores de transcripción como c-Myc e c-Jun (Pearson *et al.*, 2001). Existen 3 tipos de MAPK: as ERK, p38 e as JNK (*Jun N-terminal kinases*), e isto determina os 3 tipos de rutas Ras/MAPK existentes e que transmiten sinais de diferente tipo. JNK e p38 transducen sinais de resposta a citocinas e estrés ambiental, mentras que ERK 1/2 regula a progresión do ciclo celular e a proliferación (Mor & Philips, 2006). Moitas citocinas (principalmente IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e GM-CSF) activan esta vía (Welham *et al.*, 1992), pero algunhas só o fan en determinados tipos celulares, como por exemplo IL-4 que a activa só en linfocitos B.

Á parte dos mecanismos de sinalización específicos de cada familia de receptores, as citocinas poden activar mecanismos comúns ás distintas familias e incluso a outros sistemas de receptores.

## **2.4 O TCR E A RESPOSTA INMUNE**

O TCR (*T-cell receptor*) é un heterodímero que está composto por 2 cadeas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) similares ás inmunoglobulinas e que están asociadas á membrana plasmática. Existe unha variante do TCR presente nalgúns células T e que contén as cadeas  $\gamma$  e  $\delta$ .

O TCR ten como principal característica a súa especificidade no recoñecemento do antígeno. Isto débese á variabilidade xerada pola reordenación de varios segmentos xénicos, existindo varias familias multixénicas (unha para cada cadea do TCR), o que orixina gran

heteroxeneidade nas secuencias primarias, que dan lugar a múltiples respostas ó longo do desenvolvemento do linfocito T.

As cadeas  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR son as encargadas de unirse ó antíxeno unido ás moléculas MHC na superficie das APCs, pero non son capaces de transmitir sinais por si mesmas, por iso o TCR está asociado a un complexo de proteínas de membrana que inclúe o CD3 (composto polas cadeas  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\zeta$ ), CD4 e CD8. O complexo TCR-CD3 é o encargado de transducir o sinal ó interior celular, e xunto con outras proteínas asociadas constitúen a sinapse inmunolóxica, considerada unha plataforma onde teñen lugar eventos de sinalización. As moléculas accesorias que acompañan ó TCR na sinapse inmunolóxica permiten diferenciar entre os 2 tipos principais de linfocitos T: CD4 ou CD8, capaces de reaccionar ante moléculas MHC tipo II ou I respectivamente. Outra molécula importante asociada ó TCR é CD28, que ó interaccionar cos seus ligandos B7-1 e B7-2 proporciona o sinal coestimulador crucial para a activación das células T (Nunès *et al.*, 1996).

A activación das células T a través do TCR media a especificidade dunha resposta inmune fronte a un antíxeno (Cantrell, 1996; Lanzavecchia *et al.*, 1999). Esta activación comeza cando o linfocito T entra en contacto co antíxeno presentado polas APCs unido ó MHC. Neste momento, actívanse as quinasas da familia Src (como a Lck) que fosforila os ITAMs (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) da subunidade  $\zeta$  do CD3 asociado ó TCR, o que provoca o recrutamento e conseguinte activación da tirosín quinasa ZAP-70. Esta proteína ten dous substratos, a proteína adaptadora LAT e a SLP-76, responsables de activar outras proteínas da vía Ras de sinalización, na mobilización de  $\text{Ca}^{+2}$  ou na reorganización do citoesqueleto (Lin & Weiss, 2001).

Unha das proteínas activadas por LAT é a fosfolipasa  $\text{Cy1}$  (PLC $\gamma$ 1), responsable da produción de segundos mensaxeiros como diacilglicerol (DAG) ou inositol 1,4,5-trifosfato, que provocan

respectivamente a activación da proteína quinasa C (PKC) e das proteínas da vía Ras e regulan a liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  mediante a apertura das canles CRAC (*Ca<sup>2+</sup>-release-activated channels*) (Csutora *et al.*, 2006). A activación da vía Ras ocorre a través do recrutamento dos factores de intercambio Sos e RasGRP na membrana, que acaban por activar serín-treonín quinasas responsables da activación das MAP quinasas ERK1/2, JNK e p38 (Qian & Weiss, 1997), que fosforilan directamente factores de transcripción como o NF- $\kappa$ B, provocan a produción de citoquinas, e, en último término, a activación da célula.

Sen embargo, algúns autores como Gil *et al.*, postulan que a activación do TCR non depende exclusivamente da fosforilación dos ITAMs das cadeas do CD3, senon que existe un cambio conformacional na rexión citoplasmática da cadea  $\epsilon$  do CD3 que permitiría a unión da proteína adaptadora Nck. Ambas vías converxerían na activación da SLP-76 (Davis, 2002).

Os *rafts* parecen ter un papel importante na sinalización vía TCR, xa que a activación deste complexo provoca o enriquecemento en cadeas  $\zeta$  fosforiladas nestes microdominios, facilitando a unión a ZAP-70 e LAT, ademais de que tamén están enriquecidos en quinasas Src e poden proporcionar puntos de unión ó citoesqueleto (Kane *et al.*, 2000).

A regulación da sinalización vía TCR é moi complexa, xa que unha activación celular inapropiada podería levar a enfermidades autoinmunes, desordes inflamatorios e enfermidades linfoides, entre outros.

Tanto o proceso de transducción de sinal e activación do linfocito T como o mantemento do estado de repouso son procesos activos que dependen do equilibrio entre as actividades proteín tirosín fosfatasa (PTP) e proteín tirosín quinasa (PTK), que se pon claramente de manifesto ó inhibir estas actividades. Existen tres puntos principais na regulación do TCR:

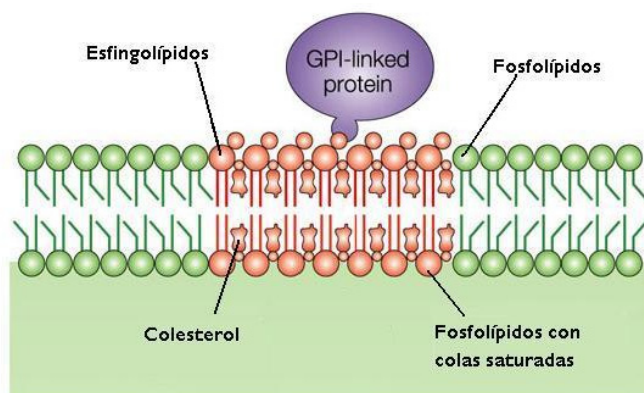
1.-Fosforilación do TCR- $\zeta$ . O recoñecemento do complexo MHC-antígeno por parte do TCR provoca un incremento da fosforilación da cadea  $\zeta$  do complexo TCR-CD3. Esta fosforilación é dependente das quinasas da familia Src, sendo imprescindible para a produción de IL-2 por parte dos linfocitos T.

2.-Actividade Tyr-fosfatasa de CD45. Variacións nas condicións de activación do TCR afectan á actividade de CD45 que leva á activación/inactivación de Lck.

3.-Balance entre GSH e ROS inducidas polo TCR como resposta das células T á activación. A produción de  $H_2O_2$  inducida polo TCR pode ser causa da prolongación da cascada de sinalización do TCR, porque a  $H_2O_2$  inactiva irreversiblemente as PTPs.

### ***2.5 RAFTS LIPÍDICOS E SINALIZACIÓN CELULAR***

O termo “rafts lipídicos”, designa as zonas ricas en colesterol e esfingolípidos que se distribúen espacialmente de forma ordenada nas membranas biolóxicas (Simons e Ikonen, 1997). Este concepto xorde das evidencias de que a membrana plasmática non é un conxunto de lípidos aleatorios, senón que ten unha estrutura concreta cunha organización e distribución de lípidos e proteínas é diferente en cada cara da membrana. Os lípidos estarían distribuídos asimetricamente en dúas capas, o que conformaría microdominios de membrana con diferente composición lipídica. Esta asimetría estrutural das membranas soe manifestarse a través dunha asimetría funcional en ambas caras da membrana.



**Figura 1.**  
**Modelo de raft lipídico.** Na figura represéntanse os principais lípidos que aparecen nos rafts.

O colesterol interacciona preferentemente cos esfingolípidos, debido á súa estrutura e á saturación das cadeas hidrocarbonadas. Aínda que non todos os fosfolípidos presentes nos *rafts* están totalmente saturados, as colas hidrofóbicas dos lípidos presentes nestes dominios están máis saturadas e empaquetadas que o resto da membrana, sendo o colesterol o que mantén a consistencia. A natureza rixida do grupo esterol e tendo en conta que o colesterol está presente nos *rafts* nunha cantidade que duplica á do resto da membrana, provoca a separación das colas hidrófobas dos esfingolípidos. Isto, xunto co forte empaquetamento dos fosfolípidos presentes nestes microdominios confírenlles unha menor fluidez que o resto da membrana (revisado en Quinn, 2010), reducindo a permeabilidade da membrana e dótanos da súa propiedade característica: a insolubilidade en deterxentes non iónicos como o Triton X-100 a 4°C (Brown & Rose, 1992), no que forman complexos ricos en glicolípidos, que flotan a baixas densidades cando se centrifugan en gradientes, debido á alta ratio lípidos/proteínas.

A gran cantidade de investigacións realizadas nos últimos anos sobre a estrutura e función dos dominios lipídicos (Edidin, 2003; Helms & Zurzolo, 2004; Lingwood & Simons, 2010; entre outros) débese a que estes foron involucrados en gran variedade de procesos celulares, como transcitose, potocitose, endocitose, internalización de bacterias, virus e

toxinas, transporte de colesterol, homeostase do calcio e sobre todo, na sinalización sinalización celular de receptores tirosin-quinasa e receptores unidos a proteína G (Hoekstra *et al.*, 2003).

En canto ó sistema inmune, os *rafts* lipídicos están implicados na sinalización vía receptor das células T (TCR), receptor das células B (BCR), receptor de IgE, etc. Observouse que os *rafts* actúan como plataformas para a ensamblaxe do TCR á membrana do linfocito que desencadea a transducción de sinais cara o interior celular. A unión dos complexos TCR ós péptidos-MHC na superficie das células presentadoras de antíxenos (APC) provoca a activación de quinasas que inician o recrutamento de receptores nos *rafts* dando lugar á formación dunha estrutura moi ordenada na interfase entre a célula T e a célula presentadora de antíxeno coñecida como sinapse inmunolóxica, ou SMAC (*supramolecular activation cluster*) (Dustin *et al.*, 1998; Grakoui *et al.*, 1999).

A sinalización a través do TCR provoca profundas modificacións na composición do *raft* (p.ex. acumulación de certas proteínas, reorganización do citoesqueleto), o que indica que os *rafts* lipídicos son estruturas altamente dinámicas. Esta afirmación vese reforzada polo feito de que o sinal vese afectado pola disgregación destas estruturas de membrana por compostos como a metil- $\beta$ -ciclodextrina ou a saponina, disminuíndo a fosforilación de proteínas intracelulares ou o fluxo de  $\text{Ca}^{+2}$ , posiblemente debido a que as proteínas tirosín-quinases presentes na cara interna dos *rafts* son desprazadas fóra deles (Ilangumaran *et al.*, 2000).

Os *rafts* poden agregarse creando sitios máis complexos nos que teñen lugar eventos de transmisión do sinal, podendo considerarse plataformas nas que se localizan simultaneamente os compoñentes das rutas de sinalización, facilitando así a interacción entre receptores, factores de unión, enzimas efectoras e substratos. A especificidade da

sinalización viría dada pola localización do receptor específico nun tipo particular de *raft* que conteña o resto de compoñentes da vía de sinalización.

As proteínas asociadas á cara externa dos *rafts* fano principalmente a través da unión a GPI (glicofosfatidilinositol), como por exemplo a fosfatasa alcalina, que pode considerarse un marcador de zona *raft* (Horejsi *et al.*, 1999). As proteínas citoplasmáticas, pola contra, asóciáanse coa cara interna dos *rafts* a través de acilacións, como é o caso de LAT (Melkonian *et al.*, 1999) ou mediante outras modificacións lipídicas. Tamén aparecen proteínas transmembrana (p.ex. CD4 e CD8) e outras moitas proteínas importantes nos procesos de sinalización celular mediada polo TCR, como é o caso das quinasas Src (Koegl *et al.*, 1994, Liang *et al.*, 2001), Lck e Fyn, implicadas na sinalización e diferenciación das células T e que implican a activación de substratos como PIP<sub>2</sub> e Ras, tamén asociados constitutivamente a estas zonas.

Ademais, diferentes subpoboacións de *rafts* presentes na superficie dunha mesma célula poden estar especializadas en realizar funcións únicas. Pode ocorrer tamén que os compoñentes necesarios para a ruta de sinalización estean situados en diferentes *rafts*, ou que un *raft* conteña unha ruta de sinalización case completa que se activaría cando un receptor ou a molécula requirida (que normalmente está situada na porción non *raft* da membrana) se recruta dentro do *raft*. O feito de que os compoñentes da ruta se sitúen en diferentes *rafts* evita que as proteínas interactúen entre si e que a ruta se active sen control (Simons & Toomre, 2000).

Este é o caso de CD45, unha proteína tirosín fosfatasa (PTP) necesaria para o inicio da cascada de transducción de sinal xerada polo ensamblaxe do TCR. Un dos substratos principais de CD45 son as quinasas da familia Src (Latour & Veillette, 2001; Hermiston *et al.*, 2002) das que parece ser un regulador positivo (sobre todo no caso de

Lck e Fyn). A modulación da actividade destas quinasas é un punto crítico na regulación da transducción de sinal nas células T. Existen tamén resultados que apuntan a unha actividade inhibitoria de CD45, xa que nalgúns liñas celulares deficientes en CD45 parece incrementarse a actividade Src (Ashwell & D'Oro, 1999).

Este dobre papel de CD45 pode representar un punto de regulación da sinalización vía TCR, plantexando incluso a posibilidade de que a célula xenere distintas respostas en función das condicións de activación nas que se atope no momento no que se produce o estímulo, ou ben, por exemplo, controlando o acceso que CD45 ten ós seus substratos (Alexander, 2000). Daí a importancia da presenza de CD45 e dos seus substratos no mesmo ou en diferentes dominios de membrana.

Independentemente da sinalización vía TCR, os *rafts* tamén participan na transducción de sinal de citoquinas, sendo o de IL-2 o caso máis estudiado (Marmor & Julius, 2001; Vamosi *et al.*, 2004). O noso grupo ten feito importantes aportacións na relación entre os *rafts* e a transducción de sinal de IL-12 (Salgado *et al.*, 2003; Canda-Sánchez *et al.*, 2009a e 2009b).

En resumo, os *rafts* poderían controlar a sinalización celular modulando as actividades intrínsecas das proteínas localizadas no seu interior, ben debido ó ambiente lipídico específico presente nos *rafts*, ben debido á cercanía dunha proteína de sinalización cunha molécula reguladora, ou tamén poderían xogar un papel importante na finalización do sinal internalizando compoñentes específicos (están implicados en procesos de endocitose).

### **2.6 SINALIZACIÓN INTRACELULAR**

Os sinais externos como as hormonas ou estímulos sensoriais son recoñecidos de forma específica por receptores que transducen o sinal



externo a unha cadea de sinalización intracelular. As vías de sinalización intracelular controlan todas as funcións da célula, como o metabolismo intermediario, a división celular, a morfoloxía e os programas de transcripción.

As células usan dúas vías principais para transducir os sinais externos: mediante receptores transmembrana ou ben utilizando segundos mensaxeiros que atravesan a membrana plasmática e que se unen a un receptor que está localizado no citosol ou no núcleo. Unha vez recibido o sinal, o receptor actívase para seguir transmitindo o sinal. Dependendo da natureza do estímulo externo, actívase unha ou outra vía de sinalización. Finalmente, desencadénanse procesos bioquímicos específicos na célula, que representan o final das rutas de sinalización.

A transducción de sinais intracelulares implica varios compoñentes que actúan de forma secuencial, e donde un compoñente lle transmite o sinal ó seguinte. As proteínas implicadas nestas vías son capaces de recoñecer especificamente os sinais, procesalos e transducilos. Trátase principalmente de receptores transmembrana, enzimas de sinalización, e outras moléculas denominadas segundos mensaxeiros como  $\text{Ca}^{+2}$ , DAG (diacilglicerol), fosfoinosítidos, AMPc, gases como NO ou CO, varias proteínas quinasas e fosfatasas e GTPasas reguladoras, cúa acción está mediada por proteínas G heterotriméricas (revisado por Lewis, 2001; Deane & Fruman, 2004 e recentemente por Hogan *et al.*, 2010). En ausencia de sinal, os transdutores de sinal están en forma inactiva. Logo de recibir o sinal, estas moléculas actívanse e só neste estado son capaces de transmitir o sinal ó seguinte paso. Para activar as proteínas sinalizadoras utilízanse mecanismos como a unión a outras moléculas sinalizadoras, transicións conformacionais, modificacións covalentes, compartimentalización, etc.

Unha vez activada, a proteína sinalizadora debe ser desactivada para rematar o proceso de sinalización. O control do tempo no que unha

proteína está activada permite regular a transducción do sinal e coordinala a través doutras vías de sinalización. Os mecanismos de desactivación son variables e poden ser intrínsecos á proteína sinalizadora, ou ben poden estar potenciados por proteínas accesorias específicas.

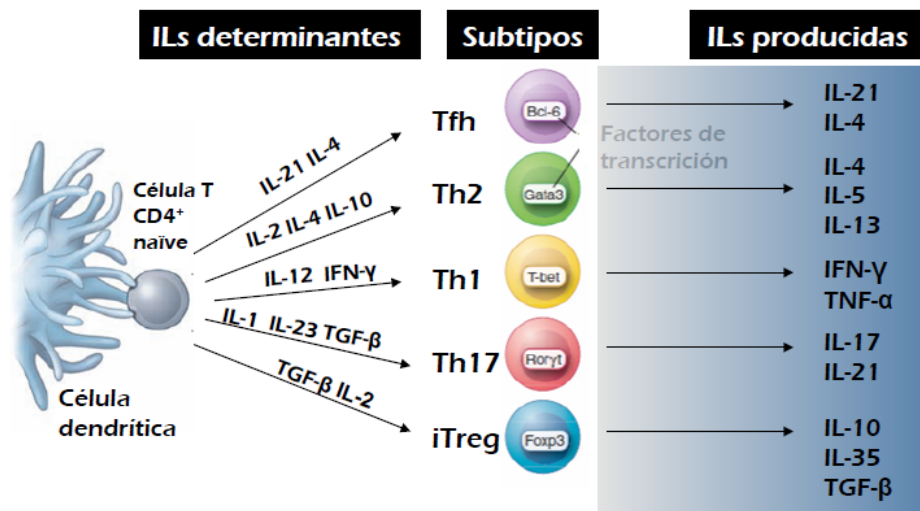
### 3. RESPONSTAS INMUNES MEDIADAS POR CÉLULAS Th

Os linfocitos T colaboradores (*T helper* ou Th) reaccionan cando unha APC lles presenta un antíxeno, proceso mediado polo MHC II. Determinan a especificidade do sistema inmunitario, interveñen na selección dos mecanismos efectores destinados a eliminar o patóxeno e melloran as funcións dos fagocitos e doutras células efectoras, axudando á súa proliferación.

A presenza dun determinado antíxeno ou sinal doutro tipo fai que ó comezo da resposta inmune as células T xeneren un patrón de citoquinas determinado, que xunto con outros factores, fan que predomine un tipo concreto de resposta fronte a agresión. Esta reacción está regulada polos linfocitos Th, que activan diferentes células efectoras do sistema inmune, como macrófagos, linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, células NK, etc.

En función do tipo de resposta que inducen, os linfocitos Th activados clasifícanse clásicamente en dúas subpoboacións ou fenotipos principais, que se diferencian polo patrón de citoquinas que secretan como consecuencia da súa activación (Abbas *et al.*, 1996). Estes patróns desenvólvense a partir de linfocitos T naïve, que tras a presentación do antíxeno e estimulación inicial, pasan a un estado previo de activación, denominado Th0. Se a estimulación persiste, xenera os denominados linfocitos Th1 e Th2. Actualmente recoñécense máis subpoboacións (ver Figura 2), entre as que se inclúen as Th17 e as células reguladoras inducidas, que se comentarán máis adiante. Existe ademais unha

subpoboación que se xenera a longo prazo e que está en estado latente preparada para unha reacción rápida fronte a unha nova aparición do mesmo antíxeno. Son os denominados linfocitos T de memoria.



**Figura 2. Subtipos principais de linfocitos Th.** Clasificación clásica, na que os subtipos considéranse liñaxes con fenotipo inflexible e patrón de produción de citocinas fixo. (adaptada de O'Shea & Paul, 2010).

As citocinas que determinan un ou outro tipo de resposta interaccionan entre elas, intensificando a súa propia resposta e inhibindo o outro fenotipo. Así, as citocinas causantes da resposta Th1 son IL-12, IFN-γ, IL-2 e linfotóxina (LT) e a IL-4 e IL-5 son as principais responsables da resposta de tipo 2. Estas citocinas son secretadas por diferentes tipos celulares.

### 3.1 AS RESPOSTAS Th1 e Th2

As respostas Th1 e Th2 son efectivas fronte a patóxenos intra e extracelulares respectivamente e son inducidas según o patrón de citocinas que estén presentes durante a expansión clonal das células T específicas de antíxeno. As citocinas que se producen durante a resposta innata, así como a expresión de diferentes moléculas de superficie, dirixen a diferenciación das células T cara un tipo de resposta

adaptativa. A IL-4 foi a primeira citocina que se describiu como responsable da xeración de respostas Th2 *in vitro* a partir de células T CD4<sup>+</sup> naïve (Swain *et al.*, 1990). Posteriormente tamén se viu que era necesaria a coestimulación CD3/CD28 e a presenza de IL-2. No caso de que IL-4 fora neutralizada e IL-12 estivera presente no cultivo, as células T CD4<sup>+</sup> naïve desenvolveríanse cara células Th1 (Hsieh *et al.*, 1993).

A resposta Th1 está relacionada con reaccións de tipo inflamatorio mediadas por células, a activación de funcións de tipo citotóxico e a inducción de reaccións de hipersensibilidade retardada. Durante este proceso secrétanse IFN- $\gamma$  (Lighvani *et al.*, 2001) e, en menor medida, IL-2 que orixinan a expansión clonal dos linfocitos Tc, a activación dos macrófagos (potenciando a súa actividade antimicrobiana) e tamén a xeración de anticorpos IgG que median a activación do complemento. Ademais estimula a produción de IL-12 mediante unha retroalimentación positiva por parte de macrófagos e células dendríticas (Hsieh *et al.*, 1993). Para o desenvolvemento do fenotipo Th1 é necesaria a expresión do factor de transcrición T-bet e de STAT4 (Thieu *et al.*, 2008).

As células Th2, cuías citocinas máis representativas son a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, fomentan a produción de anticorpos como IgE (inicia reaccións de hipersensibilidade) ou IgG (media reaccións de tipo alérxico) e activan os eosinófilos. Algunhas das citocinas producidas polas células Th2 teñen actividade anti-inflamatoria, como IL-4 ou IL-13, que antagonizan a activación dos macrófagos por parte do IFN- $\gamma$ , o TGF- $\beta$  ou a IL-10, que suprime a produción de IL-2 e IFN- $\gamma$  por parte das células T e de IL-12 por parte de células dendríticas e macrófagos. O balance final da resposta Th2 é a inhibición da inflamación tanto crónica como aguda, o que lles confire ás células implicadas unha importante función como reguladoras da resposta inmune. (Mosmann & Coffman, 1989). Ademais expresan o factor de transcrición GATA-3 (Zheng & Flavell, 1997) que activa un promotor da IL-4 necesaria para o desenvolvemento deste subtipo de células T.

A regulación cruzada dos dous tipos de resposta mediante a inhibición das citoquinas propias de cada unha delas podería explicar a forte diverxencia dos mecanismos empregados na resposta inmune para responder ante a gran variedade de patóxenos.

Unha célula T naïve (ou Th0) é unha célula T diferenciada e madura, pero distínguese das células T activadas e das de memoria porque aínda non recoñeceu ningún antíxeno na periferia. Os fenotipos Th1 e Th2 orixínanse durante unha resposta inmune a partir destas células Th0, en función dos niveis de expresión de diferentes citoquinas, e doutros factores que suceden durante a activación dos linfocitos T. Diferentes tipos de patóxenos poden desencadear respostas distintas, pero non se coñece o mecanismo polo que isto ocorre. Incluso poden alternar ambos tipos de resposta. Pode ocorrer que o tipo de resposta desencadeada esté determinada no momento da presentación do antíxeno, variando en función da afinidade do complexo TCR-péptido-MHC. Outro factor que pode determinar un ou outro fenotipo é a dose de antíxeno presentado, xa que unha baixa concentración do antíxeno parece favorecer unha resposta Th1. Tamén parecen influír os sinais coestimulatorios procedentes das APCs. O que si está claro é que o grao de polarización Th1/Th2 é maior se a resposta inmune é crónica, xa que aumenta o tempo de contacto co antíxeno.

As interaccións entre as citoquinas do modelo Th1/Th2 son máis complexas en certos organismos, xa que non se trata dun modelo lineal e unhas citoquinas poden influír sobre outras suprimindo ou aumentando a súa expresión e, polo tanto, o tipo de resposta inmune que se desencadea. Á parte disto, moitas das citoquinas consideradas “chave” neste modelo clásico de subpoboacións de células Th, vistas como liñaxes, con fenotipo inflexible, marcadores concretos e patróns invariables de citoquinas secretadas, son producidas tamén por outras células do sistema inmune, o que fai que este modelo sexa demasiado

simple para explicar a diferenciación das células T (revisado en Zhu *et al.*, 2010).

### 3.2 A RESPOSTA Th17

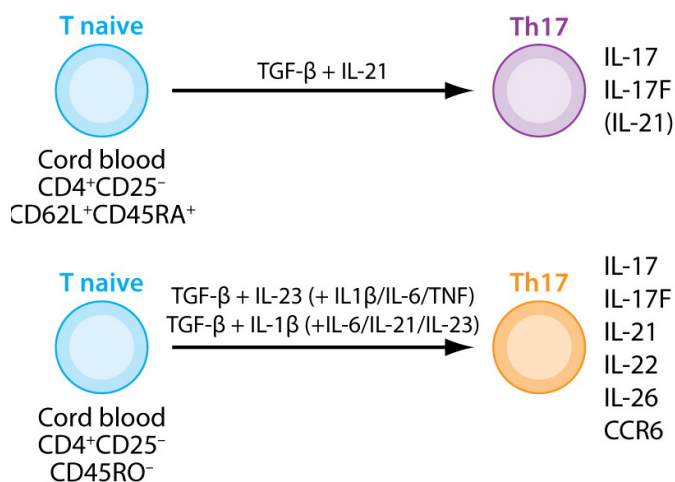
As células T *helper* 17 (Th17) son un subtipo de células T colaboradoras CD4<sup>+</sup> descuberto recentemente e que se caracteriza pola produción de IL-17. Desenvólvense a partir de células T naïve por vías evolutivamente diferentes ás Th1 e ás Th2 (Harrington *et al.*, 2005), e aínda que foron descritas inicialmente como un poboación patoxénica implicada en autoinmunidade, na actualidade sábese que teñen as súas propias funcións efectoras e reguladoras.

Tamén parecen participar en procesos inflamatorios e en dano tisular, á parte de desenvolver unha función antimicrobiana nas barreiras epiteliais e mucosas mediante a produción de citoquinas (como a IL-22) que estimulan as células epiteliais para producir proteínas antimicrobianas. Esta función proinflamatoria permítelles facer de ponte entre a inmunidade innata e a adaptativa (Matsuzaki & Umemura, 2007).

Non se coñece con exactitude o patrón de citoquinas que leva á fenotipo Th17, pero parece que na súa diferenciación inicial están implicados a IL-23, o TGF- $\beta$ , a IL-1 $\beta$ , a IL-21 producida polas propias Th17 e a IL-6. A inducción da expresión dos IL-23R e a diferenciación Th17 por IL-6 e a propia IL-23 está mediada por TGF- $\beta$  (Morishima *et al.*, 2009), sen embargo existe outro mecanismo de diferenciación das Th17 independente da IL-23. Neste caso, a IL-23 non induce a diferenciación Th17 a partir de células T naïve, pero é necesaria para o desenvolvemento de poboacións xa establecidas (Bettelli *et al.*, 2006). Ademais, o IFN- $\gamma$  e a IL-4, os principais responsables da diferenciación Th1 e Th2 son reguladores negativos da diferenciación Th17 (Manel *et al.*, 2008). Tamén está involucrada a IL-35 que exerce un papel dual, xa que *in vitro* é capaz de suprimir a diferenciación Th17 mentras que *in vivo*

aumenta a produción de IFN- $\gamma$ , inhibidor da mesma (Niedbala *et al.*, 2007).

Outras proteínas involucradas serían STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), e os receptores orfos asociados a ácido retinoico ROR $\alpha$  e ROR $\gamma$  (*Retinoic-acid-receptor-related Orphan Receptors*) (Dong, 2008). En concreto ROR $\gamma$ t é o factor de transcripción clave implicado no proceso (Ivanov *et al.*, 2006), xa que é necesario para que sexa efectiva a resposta a IL-6 e TGF- $\beta$  e induce a transcripción de xenes que codifican IL-17 nas células T naïve (Ivanov *et al.*, 2006). A activación Th17 parece ser independente de STAT1, T-bet, STAT4 e STAT 6. Existe tamén unha relación coas células dendríticas, que son inductoras da produción de Th17 en cultivo (as denominadas Th17-1) (Dhodapkar *et al.*, 2008).



**Figura 3. Factores necesarios para inducir o desenvolvemento de células Th17** a partir de células T naïve en humanos. A IL-23 pode ser necesaria para obter un fenotipo efector Th17 (laranxa). (Adaptado de Korn *et al.*, 2009).

As células Th17 están inversamente relacionadas coas células T reguladoras FoxP3<sup>+</sup> (Tregs, das que se falará no apartado 4), xa que o TGF- $\beta$  induce a expresión de FoxP3 en células T naïve (e, por tanto, o desenvolvemento de Tregs) mentres que a IL-6 suprime esta indución.

Ademais, TGF- $\beta$  e IL-6 en conxunto (nunca por separado) inducen a expresión de ROR $\gamma$ t e o programa de transcripción das Th17 e non das Treg (Zhou *et al.*, 2008). A nivel molecular, o balance entre as células Th17 e Tregs FoxP3<sup>+</sup> está mediado pola interacción antagonista entre ambos factores de transcripción (FoxP3 e ROR $\gamma$ t) (revisado en Korn *et al.*, 2009).

### 3.3 OUTROS SUBTIPOS DE LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup>

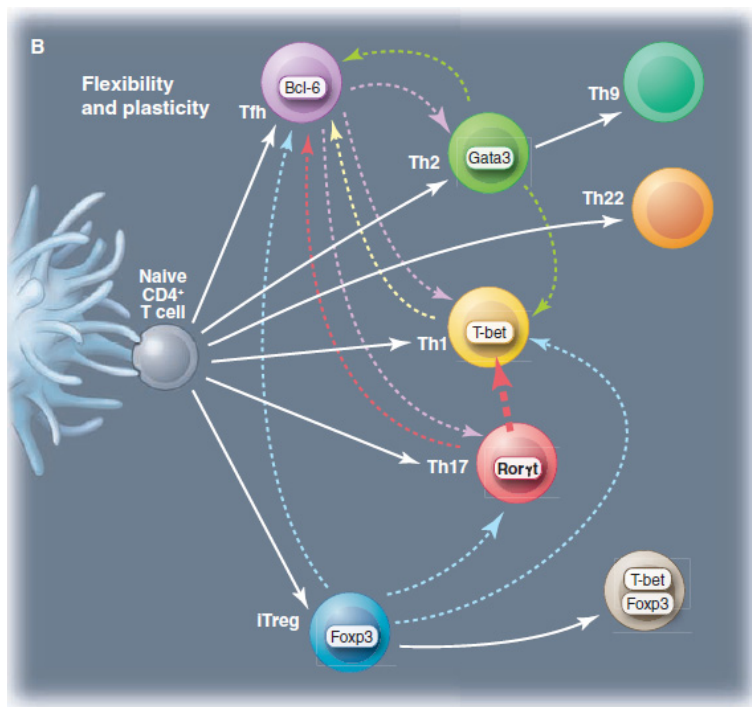
A caracterización dun novo subtipo de células T, as Th17 (Park *et al.*, 2005) introduciu novas dúbidas no modelo clásico Th1/Th2. Hai outros tipos de células T que poden influir na expresión e activación das células Th, como as nTregs –das que se falará no apartado 4–, os subtipos Th3 (que nun primeiro momento teñen actividade activadora e producen citoquinas para logo converterse nun subtipo aparentemente regulador, Weiner, 2001) e Th9 (productoras de IL-9 e que parecen participar na defensa de infeccións por helmintos (Nowak *et al.*, 2009), que teñen patróns de citoquinas menos coñecidos.

Ademais, tal como se viu na Figura 2, as células T CD4<sup>+</sup> naïve poden diferenciarse noutros tipos celulares á parte de Th1, Th2 e Th17. Son as iTregs: células T reguladoras inducidas pola presenza de TGF- $\beta$ , con características similares ás T reguladoras naturais (tamén expresan o factor de transcripción FoxP3), pero diferente orixe (Chen *et al.*, 2003), e as Tfh: células T foliculares, que aparecen en órganos linfoides secundarios axudando na súa función ás células B e que expresan o receptores propios destas células como CXCR5 (King *et al.*, 2008). Para a diferenciación das células Tfh é necesaria a expresión do factor de transcripción Bcl-6 (Yu *et al.*, 2009).

Estes descubrimentos fan que o modelo clásico quedara obsoleto (Zhu *et al.*, 2010). Proponse na Figura 4 unha hipótese na que as células Th son moito máis heteroxéneas, plásticas e flexibles a tódolos niveis. As poboacións diferenciadas de células T CD4<sup>+</sup> *in vitro* son capaces de



alterar o patrón de citocinas que secretan e incluso a expresión de marcadores, aínda que non se sabe con claridade o que ocorre *in vivo*. O destino das células T non está restrinxido a 2 nin a 4 liñaxes Th, se non que hai necesidade de múltiples subpoboacións especializadas (O'Shea & Paul, 2010).



**Figura 4. Diferenciación de células Th.** Estudos recentes revelaron unha maior flexibilidade na produción de citocinas en traballos anteriores, resultando nunha maior plasticidade nos fenotipos. Isto tamén afecta ós marcadores que expresan. (O'Shea & Paul, 2010).

## 4. CÉLULAS REGULADORAS

As células T reguladoras (ou células T supresoras) son unha subpoboación especializada de células T que actúan suprimindo a activación do sistema inmune e mantendo a súa homeostase e a tolerancia a auto-antíxenos. Existen máis tipos de células reguladoras á parte das células T  $CD4^+$ , tamén poden ser  $CD8^+$ , células B, NK, etc.

As células reguladoras son compoñentes do sistema inmune que xogan un papel crítico no control da autoinmunidade mediada por células T, suprimindo a proliferación e a produción de citoquinas por parte doutras células T. Foron orixinalmente descubertas por Gershon & Kondo en 1970 e anos máis tarde, observouse que a aplicación de IL-10 *in vitro* a células T CD4<sup>+</sup> lles confería a capacidade de regular respostas inflamatorias tipo TH1, aínda que posteriormente se observou que non era indispensable a IL-10 para que as células T reguladoras (Tregs) fosen activas, por iso se clasificaron en Treg naturais ou nTregs (independentes de citoquinas) e inducibles (iTregs). As nTregs fórmanse no timo de forma natural e dependen do contacto celular para operar, tendo a IL-2 e, polo tanto, CD25 (a cadea  $\alpha$  do IL-2R) un importante papel na súa función. Ademais, existe unha poboación que pode desenvolverse na periferia en casos concretos, como despois do contacto cun antíxeno: as iTregs. Existen 2 tipos de iTregs: as de tipo 1 (Tr1) e as T *helper* 3 (Th3). As primeiras están inducidas por IL-10 e carecen de FoxP3 (Vieira *et al.*, 2004). As Th3 están inducidas polo TGF- $\beta$  e expresan FoxP3 (Carrier *et al.*, 2007). Ambos tipos exercen un papel no desenvolvemento da autoinmunidade e promoven a tolerancia ós transplantes.

### 4.1 ORIXE E FUNCIÓN

Tódalas células T proveñen das células proxenitoras da médula ósea e son CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> TCR<sup>+</sup>. Non se coñece exactamente o proceso de selección das Tregs no timo, pero algunhas hipóteses defenden que parece estar determinada pola afinidade ou interacción co autopéptido do complexo MHC: se unha célula T recibe sinais moi fortes entrará en apoptose, se recibe sinais moi débiles, sobrevivirá e convertirase nunha célula efectora. No caso de que reciba sinais intermedios, convertirase en reguladora.

No propio timo, logo do reordenamento do TCR, as células T precursoras sofren un proceso de selección positiva e negativa para seleccionar aquelas que poden recoñecer antíxenos no contexto de moléculas de MHC propias e que non recoñecen compoñentes propios. No primeiro paso na corteza tímica selecciónanse células que recoñecen o MHC propio cunha afinidade intermedia e na segunda (que ten lugar na médula tímica a continuación da selección positiva), elimínanse por apoptose as células T que recoñecen compoñentes propios. Ó remate deste proceso, só abandonan o timo como células maduras un 5% dos timocitos iniciais.

Para funcionar correctamente, o sistema inmune debe distinguir entre o propio e o alleo. Cando esta discriminación falla (xa que o reordenamento ó azar dos segmentos xénicos do TCR e das inmunoglobulinas para xenerar os receptores de linfocitos T e B xenera unha proporción de células autorreactivas) o sistema inmune destrúe células e tecidos do corpo causando enfermidades autoinmunes. As células reguladoras suprimen a activación do sistema inmune e preveñen a autorreactividade patolóxica. Este papel crítico das células reguladoras ponse en evidencia cando deficiencias xenéticas nestas células provocan graves enfermidades autoinmunes. Aínda que a función inmunosupresora das nTregs prevén a autoinmunidade, este efecto non é desexable durante os procesos de resposta inmune, polo que ten que haber algún mecanismo que impida ou reduza a súa función cando é necesario. Tanto a propia infección como os produtos derivados dela poden activar as Tregs ou inhibilas en caso necesario.

As células Tregs son supresores pluripotenciais capaces de modular *in vivo* distintas respostas inmunes. *In vitro*, inhiben a proliferación e diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> naïve (Thornton & Shevach, 1998; Oldenhove *et al.*, 2003), preveñen a actividade citotóxica das células T CD8<sup>+</sup> (Piccirillo & Shevach, 2001; Murakami *et al.*, 2002) suprimen a activación e a produción de anticorpos por parte das células

B (Sakaguchi *et al.*, 1995; Bystry *et al.*, 2001) e limitan a actividade das células do sistema inmune innato (Maloy *et al.*, 2003).

Non se coñece con exactitude o mecanismo polo cal as Tregs exercen a súa actividade supresora/reguladora. Os experimentos *in vitro* parecen requiren o contacto célula-célula, sendo a supresión independente de citoquinas (Takahashi *et al.*, 1998; Thornton & Shevach, 1998). Sen embargo, nos experimentos *in vivo* parecen estar implicadas as citoquinas inmunosupresoras TGF- $\beta$  e IL-10 (Asseman *et al.*, 1999; Annacker *et al.*, 2001). Como xa se comentou, a IL-10 é unha citoquina que regula a proliferación e a diferenciación de células B, timocitos e mastocitos. Ten a capacidade de inhibir as células Th1, xa que bloquea as APCs para producir IFN- $\gamma$ , e así a diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> cara Th1, ademais de bloquear a produción de IL-12. Estas propiedades permitirían o seu uso en respostas inflamatorias crónicas mediadas por Th1 e podería limitar o dano tisular colateral ó inducir a proliferación das Tregs. Tamén parece que puideran suprimir respostas Th2 mediante a produción de TGF- $\beta$ , pero de xeito menos efectivo.

### 4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Como outras células T, as Tregs desenvólvense no timo. As Tregs están definidas clasicamente por ser células T CD4<sup>+</sup> con altos niveis de expresión de CD25 (Sakaguchi *et al.*, 1995) e tamén por baixos niveis de CD127 (Seddiki *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006). Entre un 5 e un 10% das células CD4<sup>+</sup> son células reguladoras CD25<sup>+</sup>. Caracterízanse pola expresión do factor de transcripción FoxP3 (Hori *et al.*, 2003; Khattri *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003), que é necesario para o desenvolvemento destas células. A gran maioría das células reguladoras que expresan FoxP3 son ademais CD4<sup>+</sup> e tamén expresan altos niveis da cadea  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25). Existe tamén unha pequena poboación de células reguladoras que son CD8<sup>+</sup> e que tamén expresan FoxP3.

Existen outros marcadores de Tregs como CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4*, Read *et al.*, 2000) e GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor*, Shimizu *et al.*, 2002). CTLA-4 ou CD152 é un marcador que se considera crítico para a función supresora das nTregs (Read *et al.*, 2000; Flores-Borja *et al.*, 2008). Recentemente identificouse CD39 como marcador de Tregs (Borsellino, 2007) e CD49d como marcador de selección negativa (Kleinsteinfeld *et al.*, 2008). Na Táboa 1 (páxina seguinte) recóllense algúns dos principais marcadores de nTregs.

Marcador	Descrição	Expressão	Referência
CCR4	Marcador de activação, expressado em Th2	+	Hirahara <i>et al.</i> , 2006
CCR6	Marcador de células de memória sen activar	+	Hirahara <i>et al.</i> , 2006
CCR7	Implicado en tráfico transendotelial	+	Tosello <i>et al.</i> , 2008
CD4	Co-receptor da sinalização via TCR	+	Sakaguchi <i>et al.</i> , 1995
CD25	Cadeia $\alpha$ do IL-2R	++	Sakaguchi <i>et al.</i> , 1995
CD39	Ectonucleotidasa	+	Mandapathil <i>et al.</i> , 2010
CD45RA	Marcador de fenotipo naïve	-/low	Venken <i>et al.</i> , 2008
CD45RO	Marcador de fenotipo de memória	++	Baeher-Allan <i>et al.</i> , 2001
CD49d	Integrina	-	Kleinewietfeld <i>et al.</i> , 2008
CD62L	Molécula de adesão	-/+	Ermann <i>et al.</i> , 2005
CD69	Marcador de activação	+	Sánchez <i>et al.</i> , 2004
CD73	Ectonucleotidasa	+	Mandapathil <i>et al.</i> , 2010
CD103	Integrina	-/+	Allakhverdi <i>et al.</i> , 2006
CD122 (IL-2R $\beta$ )	Cadeia $\beta$ do IL-2R	+	Wood & Sakaguchi, 2003
CD127	Receptor da IL-7	-/low	Seddiki <i>et al.</i> , 2006
CD152 (CTLA-4)	Transmite sinais inibitórios á célula T	++	Read <i>et al.</i> , 2000
CD154 (CD40L)	Marcador de activação e coestimulador	-	Cohen <i>et al.</i> , 2006
CD223/LAG-3	Homólogo de CD4	-	Huang <i>et al.</i> , 2004
CXCR4	Receptor de quimioquinas	+	Lim <i>et al.</i> , 2006
CXCR5	Receptor de quimioquinas	-/low	Lim <i>et al.</i> , 2006
FoxP3	Factor de transcrição	++	Hori <i>et al.</i> , 2003
GITR	Regulador da célula T, implicado en apoptose	++	McHugh <i>et al.</i> , 2002
Granzima B	Serín proteasa, induce apoptose	+	Cao <i>et al.</i> , 2007
IL-10	Citoquina anti-inflamatória	+	Levings <i>et al.</i> , 2001
IL-35	Citoquina supressora da resposta imune	+	Collison <i>et al.</i> , 2007
Neuropilina I	Involucrada en activación	+	Sarris <i>et al.</i> , 2008
Perforina	Proteína citolítica	+	Grossman <i>et al.</i> , 2004
TGF- $\beta$	Factor de crescimento	+	Yamagiwa <i>et al.</i> , 2001

Táboa 1. Principais marcadores de células T reguladoras.

## 5. A INTERLEUQUINA 12

### 5.1 A MOLÉCULA E O RECEPTOR

A IL-12 é interleuquina moi importante na regulación da resposta inmune mediada por linfocitos T. Trátase dunha molécula heterodimérica de aproximadamente 70 kDa formada por 2 subunidades de 35 kDa (p35) e 40 kDa (p40), unidas por pontes disulfuro (Podlaski *et al.*, 1992). A subunidade p35 ten unha estrutura de dominio globular de 4 hélices  $\alpha$  e a p40 é análoga ós receptores de citoquinas de tipo I. Denomínase tamén factor estimulador de células NK (NKSF) -que foi como se descubriu (Kobayashi *et al.*, 1989)- factor de maduración de linfocitos citotóxicos (CLMF) -como se illou máis tarde-, ou factor estimulador de células T (TSF). Cando se purificaron estes factores e se viu que eran o mesmo, empezouse a denominar interleuquina 12 (Gately *et al.*, 1991).

A cadea p35 é un polipéptido de 219 aminoácidos, mentres que a p40 ten 328. Os xenes que as codifican sitúanse, respectivamente, en 3p12-3q13.2 e 5q31-q33 (Sieburth *et al.*, 1992). A cadea p35 ten estrutura típica de citoquina mentres que a p40 é análoga á unha cadea do receptor da IL-6 (Gearing & Cosman, 1991). A unión entre ambas cadeas é irreversible e mantense no dímero non ligado covalentemente.

As principais células produtoras de IL-12 son os fagocitos mononucleares activados e as células dendríticas. Parece que hai máis tipos celulares que sintetizan a subunidade p35, pero que só as células presentadoras de antíxenos (APCs) producen a subunidade p40, e polo tanto, a citoquina bioloxicamente activa durante as fases de inducción e efectora das respostas inmunitarias celulares. Existen diferentes estímulos que inducen a produción de IL-12, como as infeccións virais ou bacterianas ou moléculas derivadas como o lipopolisacárido. Ademais, as células T colaboradoras, estimuladas polo antíxeno, inducen a produción de IL-12 nos macrófagos e nas células dendríticas por

mediación do CD40L. O IFN- $\gamma$  producido polas células T ou polas células NK tamén estimula a liberación de IL-12 (Watford *et al.*, 2003).

O receptor de IL-12 é un heterodímero constituído polas subunidades  $\beta 1$  e  $\beta 2$  (Presky *et al.*, 1996; Gately *et al.*, 1998). As cadeas por separado recoñecen a IL-12 con pouca afinidade, pero tra-la dimerización inducida pola unión do ligando, convírtense nun receptor de alta afinidade. O receptor de IL-12 exprésase fundamentalmente en células T activadas e células NK, aínda que hai expresión constitutiva de IL-12R $\beta 1$ , pero a cadea  $\beta 2$  non está presente en células en repouso. Tamén se expresa noutros tipos celulares como células dendríticas (DC) e células da liña B. A activación das células T a través do TCR regula a transcripción e a expresión das dúas cadeas do receptor, en particular da cadea IL-12R $\beta 2$ , que está limitada ás células Th1 e se ve potenciada pola propia IL-12, polo IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF e pola coestimulación vía CD28. A activación do IL-12R activa a vía JAK-STAT de transducción de sinal.

O noso grupo postulou sobre unha distribución diferencial de ambas cadeas, atopando IL-12R $\beta 1$  en dominios ricos en fosfolípidos. Namentres, IL-12R $\beta 2$  aparecía principalmente en zona *raft* (Canda-Sánchez *et al.*, 2009a), feito que se relaciona coa activación da vía JAK2-Ras-MEK-ERK, formándose o receptor de alta afinidade nas rexións ricas en fosfolípidos.

### **5.2 REGULACIÓN DA PRODUCCIÓN DE IL-12**

A IL-12 é un produto das células inflamatorias activadas (monocitos, macrófagos, neutrófilos, microglía e células dendríticas ou DCs) (Trinchieri, 2003) e a súa produción depende de varios mecanismos de regulación da expresión dos xenes que a codifican, de patróns de expresión dos TLR (*Toll-like receptor*) e da regulación cruzada entre as distintas subpoboacións de DCs. Tamén están implicadas citoquinas como a IL-10 e os IFN de tipo I.



A produción inicial de IL-12 ocorre rapidamente, e parece ser independente do IFN- $\gamma$  e dos sinais das células T (Gazzinelli *et al.*, 1994), aínda que a produción do heterodímero de IL-12 está facilitado pola estimulación a través do ligando de CD40 (CD40L). A produción de IL-12 por parte das DCs é dependente de IFN- $\gamma$  e esta é unha das causas pola que as DCs son as iniciadoras da resposta inflamatoria, e, polo tanto, da resposta inmune.

Os dous xenes que codifican a IL-12 necesitan expresarse coordinadamente nas mesmas células para que se produza o heterodímero bioloxicamente activo (Kaplan *et al.*, 1996; Thierfelder *et al.*, 1996). En ausencia de IL-12 p35 ou IL-23 p19, a subunidade p40 secrétase como monómero ou homodímero, mentres que p35 só pode ser secretado asociado con p40. O mRNA que codifica a subunidade p35 está presente en moitos tipos celulares, aínda que non produzan o heterodímero bioloxicamente activo (D'Andrea *et al.*, 1992). Debido á baixa abundancia dos transcritos de p35, parece que esta subunidade é a limitante para a produción da citoquina activa (Snijders *et al.*, 1996).

A secreción de IL-12 está estritamente regulada por mecanismos regulatorios positivos e negativos (Ma & Trinchieri, 2001; Trinchieri, 2003). A síntese de IL-12 vese aumentada por: moléculas derivadas dos microorganismos; o IFN- $\gamma$ , que potencia a transcrición dos xenes que codifican as subunidades p40 e p35 e deste xeito forma un mecanismo de retroalimentación positiva durante as repostas inflamatoria e Th1; algunhas citoquinas, como IL-4 e IL-13 (curiosamente son citoquinas Th2); a interacción célula-célula, como no caso dos ligandos da familia do TNF, por exemplo o ligando de CD40 (CD40L), que inducen a transcrición do xen que codifica a p35 en DCs.

No sentido oposto temos: a IL-10, que é un potente inhibidor da produción de IL-12 xa que bloquea a transcrición dos xenes que codifican as dúas subunidades, ademais de que a súa concentración

parece incrementarse nesta situación, suxerindo a existencia dun mecanismo de regulación cruzada entre ambas citoquinas. (Mehrotra *et al.*, 1998); o TGF- $\beta$ , que reduce a estabilidade do mRNA de p40; o TNF e outras citoquinas como IL-11. Aínda que o IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  teñen algunhas funcións similares ás de IL-12 en termos de indución de produción de IFN- $\gamma$  e de resposta Th1, suprimen a produción de IL-12.

Existen tamén mecanismos post-traduccionais de procesamento intracelular das subunidades p35 e p40 (por exemplo a eliminación do péptido sinal de p35, translocación ó retículo endoplasmático, etc.), o que inflúe na actividade biolóxica do heterodímero.

### 5.3 TRANSDUCCIÓN DO SINAL DA IL-12

O receptor de IL-12 non ten actividade enzimática intrínseca como outros receptores de citoquinas, por iso están asociados a quinasas da familia das Janus (JAK): IL-12R $\beta$ 1 interacciona con Tyk2 e IL-12R $\beta$ 2 faino con JAK2 (Zou *et al.*, 1997; Parham *et al.*, 2002). A deficiencia en Tyk2 reduce a sinalización vía IL-12R e IL-23R (Karaghiosoff *et al.*, 2000). A deficiencia de JAK2 (IL-12R, IL-23R e IL-27R) ten consecuencias máis graves, incluíndo a letalidade embrionaria, debido á súa importancia no proceso de eritropoiese (é un receptor de eritropoietina), por iso non se pode estudar o seu papel *in vivo* na sinalización de IL-12 (Neubauer *et al.*, 1998). A transducción de sinal destas citoquinas iníciase cunha fosforilación das JAK quinasas asociadas ó receptor, as cales á súa vez son responsables de fosforilar os residuos Tyr do IL-12R $\beta$ 2 (intracelular), o que proporciona sitios de anclaxe para proteínas da familia STAT. STAT4 é a proteína máis importante usada pola IL-12 na súa ruta de transducción, pero tamén participan outros membros da familia como STAT1, STAT3 e STAT5 (Gollob *et al.*, 2000).

As JAKS (especialmente Tyk2) fosforilan os residuos Tyr da STAT4, o que provoca a dimerización da molécula mediante a asociación do dominio SH<sub>2</sub> dunha molécula cun residuo fosfotirosina da outra. O dímero translocase ó núcleo, onde un residuo de serina é fosforilado por unha proteína quinasa activada por mitóxeno (MAPK-p38). A familia das MAP quinasas é unha familia de serín-treonín quinasas conservadas evolutivamente que inclúe as quinasas reguladas por sinais extracelulares p42/44 (ERK), c-Jun N-terminal kinasas (JNK) e subfamilias da p38 MAPK (Murphy & Blenis 2006). Membros desta familia actívanse en resposta á sinalización inducida pola IL-12. A activación da MAPK p38 é necesaria para a produción de IFN- $\gamma$  (Morinobu *et al.*, 2002) á parte de mediar a fosforilación na serina 721 da STAT4, que á súa vez é necesaria para a máxima produción de IFN- $\gamma$ .

As fosforilacións en Ser e Tyr que sofre STAT4 son importantes para a produción de IFN- $\gamma$  e para a diferenciación Th1 (Morinobu *et al.*, 2002), pero non parece que TYK2/STAT4 sexan responsables dos efectos proliferativos descritos para IL-12. De feito, algúns autores opinan que poderían deberse a JAK2/ERK (Canda-Sánchez *et al.*, 2009a), PI3K/Akt (*phosphoinositide 3-kinase*) (Yoo *et al.*, 2002) ou incluso a factores de transcrición como STAT5 ou c-myc (Matikainen *et al.*, 1999).

Á parte de activar a vía Jak/STAT, IL-12 pode empregar outras moléculas e vías de sinalización. En células NK, a proteína Lck (tirosín quinasa da familia das Src) fosforílase en tirosina como resposta á IL-12, tanto en células activadas como sen activar, aínda que a función desta proteína non se coñece (Pignata *et al.*, 1995). A inhibición da sintasa de óxido nítrico de tipo II ou NOS2 (*type II nitric oxide synthase*) provoca defectos na inmunidade innata e na sinalización vía IL-12 (Diefenbach *et al.*, 1999). Noutro sentido, a familia dos supresores da sinalización de citoquinas (SOCS) inhibe as accións de certas citoquinas (Alexander & Hilton, 2004). Actúan a través da vía JAK-STAT, inhibindo compoñentes da cascada de transducción de sinal ou uníndose directamente a ditos

compoñentes para impedir o acceso ó complexo de sinalización. En concreto SOCS-1 inhibe a sinalización tanto por IFN- $\gamma$  como por IL-12 (Eyles *et al.*, 2002). SOCS-3 é un regulador negativo da sinalización vía IL-12, impedindo a unión de STAT4 á subunidade  $\beta 2$  do IL-12R (Yamamoto *et al.*, 2003).

### 5.4 FUNCÍONS BIOLÓXICAS

A IL-12 que é producida polas células dendríticas e polos fagocitos como resposta a patóxenos durante unha infección, proporciona unha importante conexión entre a inmunidade innata e a adaptativa, xa que é producida durante as reaccións de inmunidade innata precoz fronte a microorganismos intracelulares e estimula respostas inmunitarias adaptativas que protexen ó hóspede fronte a estes microorganismos. É esencial para o inicio desta cadea de respostas nas que interveñen macrófagos, células NK e linfocitos T.

As funcións biolóxicas da IL-12 foron estudias principalmente en linfocitos (Trinchieri, 2003), aínda que tamén se coñecen efectos sobre outros tipos celulares. A propiedade principal da IL-12 é a de inducir a produción de IFN- $\gamma$ , que media moitas das actividades proinflamatorias da IL-12.

#### 5.4.1 IL-12 e proliferación celular

IL-12 non induce a proliferación de células T inactivas de sangue periférico nin de células NK, aínda que aumenta a proliferación inducida por lectinas mitoxénicas, aloantíxenos, anticorpos específicos de CD3 e diésteres de forbol e ten un efecto proliferativo directo en células T preactivadas e células NK (Kobayashi *et al.*, 1989; Zeh *et al.*, 1993). En liñas CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, así como en clons Th1 de rato, IL-12 induce proliferación só cando as células son pre ou co-estimuladas co antíxeno ou con anticorpos anti-CD3, o que indica que a expresión do IL-12R

necesaria para inducir a proliferación está máis regulada polo estímulo vía TCR/CD3 do que o está a do receptor de IL-2 (Gately *et al.*, 1991).

A estimulación conxunta con IL-12 e IL-2 de células T activadas resulta nun efecto aditivo na proliferación, aínda que nalgúns tipos celulares concretos (células TCR $\gamma\delta^+$ , NKs) IL-12 inhibe a proliferación inducida por IL-2. (Perussia *et al.*, 1992) Este efecto depende do estado de activación dos linfocitos e só ocorre a altas concentracións de IL-2, podendo ser neutralizado por anticorpos anti TNF- $\alpha$ .

Por outra parte, a estimulación con B7/CD28 e IL-12 tanto en células T activadas como en PBMCs en repouso, provoca un aumento nos niveis de proliferación das células T superior ó observado coa IL-2. Requírese a activación da vía CD3/TCR para lograr o efecto máximo das dúas moléculas. A capacidade da IL-12 para inducir proliferación en células T é independente da produción de IL-2 (Kubin *et al.*, 1994).

Aínda que a IL-12 pode afectar á proliferación, diferenciación e produción de IFN- $\gamma$  das células B, algúns dos efectos xa descritos para a IL-12 nesta liña celular como son a produción de certos isotipos de inmunoglobulinas están mediadas indirectamente polas células Th1 a través dos seus produtos, en particular, IFN- $\gamma$ . Viuse que IL-12 promove a proliferación en linfocitos B preactivados, induce a diferenciación a células secretoras de anticorpos, favorece a expresión das dúas cadeas do IL-18R e do IFNR, etc. Existen 2 subtipos de células B: Be1 e Be2, similares en moitos aspectos (producción de citoquinas, ruta de sinalización) ás subpoboacións Th1 e Th2 dos linfocitos Th. Igual que no caso dos linfocitos T, IL-12 induce a diferenciación Be1, que inclúe a activación de STAT4, produción de IFN- $\gamma$  e a expresión de T-bet e IL-12R $\beta$ 2.

Tamén estimula a diferenciación dos linfocitos T colaboradores CD4 $^+$  en células Th1 que producen IFN- $\gamma$  e que activan os fagocitos na

inmunidade celular. A IL-12 tamén é un factor de crecemento para as células T.

### **5.4.2 IL-12 e produción de IFN- $\gamma$ e outras citoquinas**

A importancia dos IFN na resistencia innata non se debe só á súa actividade antiviral, senon tamén á súa capacidade para regular as funcións das células na inmunidade innata e adaptativa. En concreto, o IFN- $\gamma$  é un potente activador das funcións antimicrobianas dos fagocitos e ten un papel esencial na resistencia a moitas bacterias patóxenas, fungos e parásitos intracelulares. Aínda que o IFN- $\gamma$  foi orixinalmente considerado como un produto das células T específicas de antíxeno durante as respostas innatas, viuse posteriormente que tamén o producían as células NK e outros subtipos de células T (NKT, células T CD8<sup>+</sup>, etc). Os macrófagos, ás células dendríticas e as células B tamén teñen a capacidade de producir IFN- $\gamma$ .

Os macrófagos producen IL-12 en resposta a moitos microorganismos. A IL-12 secretada estimula, nas células NK e nas células T, a produción de IFN- $\gamma$  (Magram *et al.*, 1996), que á súa vez activa ós macrófagos para que destrúan ós microorganismos fagocitados. Polo tanto, a defensa fronte a numerosos microorganismos está mediada por citoquinas que actúan na seguinte secuencia: microorganismos-respostas dos macrófagos ós produtos bacterianos-secreción de IL-12-secreción de IFN- $\gamma$ -activación dos macrófagos-destrución dos microorganismos.

A IL-12 induce a produción de varias citoquinas nas células T e NK, como TNF- $\alpha$ , M-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-8 e IL-2 (Aste-Amezaga *et al.*, 1994; Kostense *et al.*, 1998). É particularmente eficiente inducendo a produción de IFN- $\gamma$  (Chan *et al.*, 1991), sendo requisito indispensable para a súa produción óptima, para o que tamén se require a presenza de baixos niveis de TNF e IL-1, que son normalmente producidos de forma autocrina polas células T e NK. A importancia da IL-12 como

inductora da produción de IFN- $\gamma$  está non só na súa eficiencia a baixas concentracións, senon tamén na súa sinerxia con moitos outros estímulos de tipo activador. Para as células T, IL-12 sinerxiza coa IL-2, coa estimulación do complexo TCR-CD3 e coa activación do receptor de CD28 á hora de producir IFN- $\gamma$  de forma rápida e eficiente (Chan *et al.*, 1992).

Nas células T e probablemente nas NK, existen dúas vías diferentes de produción de IFN- $\gamma$ , unha inducida pola estimulación a través do TCR, CD3 e receptores Fc, (que pode ser simulada con diésteres de forbol e ionomicina), a outra ruta inducida por estimulación con IL-12, soa ou en sinerxia con IL-18 ou B7, o ligando para CD28 (Kubin *et al.*, 1994). A expresión para o IL-12R tamén está regulada de forma diferente. IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  inducen a expresión de IL-12R $\beta$ 2 polas células T, xerando o receptor de alta afinidade, pero teñen un pequeno efecto nas células NK. A estimulación a través de CD28 tamén regula positivamente a expresión de IL-12R $\beta$ 2 e fai que as JAKs e/ou STAT4 respondan con máis intensidade á estimulación por IL-12 en células T.

Ambos tipos celulares (T e NK), en repouso ou activados, responden á IL-12 producindo IFN- $\gamma$ , pero nalgunhas condicións requiren a presenza de células accesorias HLA-DR<sup>+</sup>, que poden producir TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e o cofactor B7 (ligando de CD28) que aumenta a produción de IFN- $\gamma$ . Na presenza simultánea destes 3 cofactores é cando se observa a maior produción de IFN- $\gamma$  (Kubin *et al.*, 1994).

A IL-18 tamén é un factor inductor de IFN- $\gamma$  (Okamura *et al.*, 1998). Prodúcese en condicións de activación similares ás de IL-12, coa que sinerxiza, xa que por si mesma non ten ningún efecto sobre a produción de IFN- $\gamma$ . A IL-12 induce a expresión das dúas cadeas do receptor IL-18, do mesmo xeito que esta última citoquina fai o mesmo coa cadea  $\beta$ 2 do IL-12R en células en repouso (Chang *et al.*, 2000). Curiosamente, a IL-18 non xenera unha resposta Th1 como fai a IL-12, e incluso pode estimular

a resposta antagónica Th2. Tamén a IL-27 sinerxiza con IL-12, en presenza ou ausencia de IL-18 ou estimulación vía CD28 para inducir a produción de IFN- $\gamma$  por células T naïve.

### **5.4.3 Efectos citotóxicos da IL-12.**

A IL-12 potencia a xeración de linfocitos T linfotóxicos (CTL, *cytolytic T lymphocytes*) e células LAK (*Lymphokine activated killer cells*) e aumenta a actividade citotóxica de CTLs e células NK (DeBlaker-Hohe *et al.*, 1995) debido en parte á indución da transcrición de xenes que codifican moléculas asociadas a gránulos citotóxicos, como a perforina e as granzimas, e aumentando a expresión de adherinas (Gately *et al.*, 1992). Este efecto é menor que o observado no caso da IL-2, e é máximo en presenza de ambas citoquinas. Ademais, a IL-12 dálles ás células T a capacidade de mediar a lise de células diana con receptores Fc, recubertas de anticorpos anti CD3.

## **5.5 IL-12 E A RESPOSTA Th1**

IL-12 é un potente inductor das respostas Th1 (Hsieh *et al.*, 1993; Macatonia *et al.*, 1995) e é necesaria para un óptimo desenvolvemento destas células durante a resposta inmune a patóxenos. Esta diferenciación determínase nun momento temperán despois da infección, probablemente polo balance entre a IL-12 e a IL-4, que favorecen as diferenciacións Th1 e Th2 respectivamente.

A IL-12 que se produce *in vivo* durante a fase inflamatoria promove a produción de IFN- $\gamma$  por parte das células T e NK. Logo, a IL-12, posiblemente en colaboración co IFN- $\gamma$  induce ós clons de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) que se están expandindo como resposta a antíxenos específicos a diferenciarse en células Th1, ben preparándoas para a expresión de citoquinas como o propio IFN- $\gamma$ , ben por outros mecanismos de selección positiva e negativa que inclúen por exemplo a



delección de células productoras de IL-4 ou a expansión preferencial de poboacións celulares con fenotipo Th1 (Athie-Morales *et al.*, 2004).

Aínda que non hai dúbidas de que na presenza de IL-12 se obteñen respostas Th1 eficaces, existen evidencias que apuntan que IL-12 pode non ser un requisito indispensable estando máis involucrada na expansión do fenotipo Th1 que na súa diferenciación. De feito, a sinalización vía TCR induce a polarización temprana de células T naive a Th1 independentemente da IL-12. Ademais, a IL-12 está implicada na reactivación e supervivencia das células T CD4<sup>+</sup> de memoria (Yoo *et al.*, 2002).

As células CD4<sup>+</sup> necesitan IL-12 para desenvolver o fenotipo Th1, mentres que as CD8<sup>+</sup> requiren a presenza de IL-4 para unha resposta Th2, á parte dunha apropiada sinalización temperá vía TCR (Noble *et al.*, 2001). As células Th1 caracterízanse pola expresión de T-bet, que é un factor de transcrición da familia T-box que induce a expresión de IFN- $\gamma$ . A expresión deste factor está inducida en células T que se están polarizando, nas que tamén aumenta a expresión de IL-12R $\beta$ 2 (Afkarian *et al.*, 2002). Viuse que IL-12 induce a supervivencia e a división celular en células Th1 e intensifica a síntese de IFN- $\gamma$ . Aínda que IL-12 non está relacionada coa produción de T-bet, si o está o produto da súa activación nas células T: IFN- $\gamma$ . Así, o eixo IL-12/IFN- $\gamma$  pode amplificar a diferenciación a Th1 en conxunto coa sinalización vía TCR ou outros receptores.

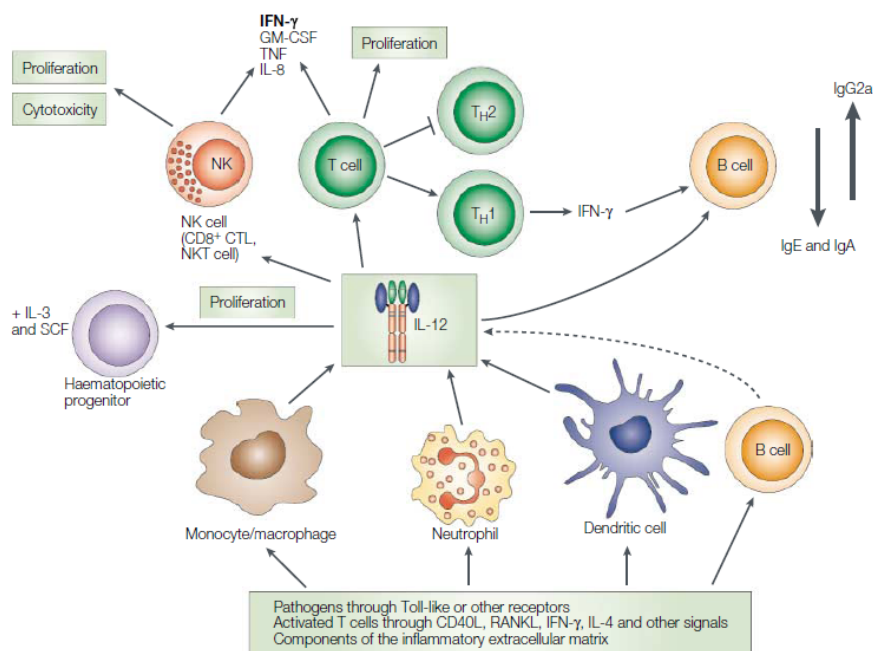
### **5.5.1 IL-12 e resistencia a infeccións e tumores.**

IL-12 é un potente inductor da produción de IFN- $\gamma$  *in vivo* durante a resposta inmune, particularmente durante as infeccións por bacterias ou por parásitos. O IFN- $\gamma$  activa os macrófagos e potencia a súa actividade bactericida, proporcionando un mecanismo de activación de macrófagos independente das células T durante as fases temperás da resistencia innata ás infeccións. A capacidade da IL-12 de inducir e

## 1. Introducción

manter as respostas Th1 específicas de antixeno é esencial para controlar infeccións causadas por moitos patóxenos. IL-12 ten unha forte actividade anti tumoral, polo que o seu uso terapéutico en cancro está sendo estudado (Leder *et al.*, 1995).













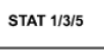
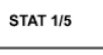
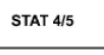
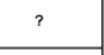
Os efectos da IL-12 como inmunomodulador (ben soa ou combinada con outras citoquinas) son ben coñecidos (Del Vecchio *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2007). Estase traballando en ensaios clínicos coa IL-12 recombinante para estimular respostas inmunitarias celulares protectoras en pacientes con inmunodeficiencias e cancro, tanto como tratamento sistémico como compoñente de vacinas (revisado en Jinushi & Tahara, 2009).



**Figura 5. Efectos biolóxicos da IL-12** (tomado de Trinchieri, 2003). Os principais produtores de IL-12 son os fagocitos (monocitos, macrófagos e neutrófilos) e as DCs como resposta a patóxenos. As súas dianas máis importantes son os proxenitores hematopoiéticos (onde sinerxiza con outros factores, estimulando a proliferación), as células NK e as células T, onde induce proliferación, aumenta a citotoxicidade e a produción de citoquinas (sobre todo IFN-γ) promovendo a diferenciación Th1.

## 5.6 OUTROS MEMBROS DA FAMILIA IL-12

A familia da IL-12 inclúe, á parte da IL-12, outras citoquinas relacionadas como a IL-23 (Oppmann *et al.*, 2000), IL-27 (Pflanz *et al.*, 2002) e a recentemente identificada IL-35 (Collison *et al.*, 2007). Como se aprecia na Figura 6, todas son citoquinas heterodiméricas compostas por unha cadea  $\alpha$  (p19, p28 ou p35) e outra  $\beta$  (p40 ou Ebi3) e o sinal transdúcese a traves de receptores formados por dúas das seguintes cadeas: IL-12R $\beta$ 1, IL-12R $\beta$ 2, IL-23R, gp130 e WSX-1. A IL-23 promove a resposta Th17 e a produción de citoquinas derivadas deste patrón, mentres que a IL-27 é un factor limitante da resposta inflamatoria, inhibindo a diferenciación das Th17. IL-35 foi descrita unicamente en células reguladoras FoxP3<sup>+</sup> e a súa función é moi diferente á do resto de membros da familia, xa que ten unha función anti inflamatoria inhibindo a proliferación de células T, e pode que incluso, doutros tipos celulares (Collison & Vignali, 2008).

	IL-12	IL-23	IL-27	IL-35
Cytokines				
Receptors				
Kinases				
Vital STATs				
Also phosphorylated	STAT 1/3/5	STAT 1/5	STAT 4/5	?
Cells that Produce	DCs, monocytes macrophages, B cells	DCs, monocytes macrophages, B cells	DCs, monocytes macrophages, B cells	Foxp3 <sup>+</sup> T <sub>regs</sub> Others?
Cells that Respond	Naïve T cells Th1 cells NK cells	Memory T cells Th1 & Th17 cells NK cells	T cells Th1 cells NK cells	T cells, Others?
Function	Th1 activation Th1 maintenance Blocks Th2	Th1 activation Th17 polarization & proliferation	Th1 cell proliferation Skewing effector T cell lineages Blocks Th17	Inhibits T cell proliferation Additional?

**Figura 6. Resume das características dos membros da familia da IL-12.** (tomada de Collison & Vignali, 2008).

### 5.6.1 IFN- $\gamma$

O interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) ou interferón de tipo II é unha citoquina producida polos linfocitos T e polas células NK. A súa función máis importante é a activación dos macrófagos e ten un papel fundamental tanto na resposta innata como na adaptativa. O seu receptor (IFNGR) é heterodimérico e consta de dúas subunidades: IFNGR1 e IFNGR2, asociadas á súa vez ás quinasas JAK1 e JAK2. É responsable da activación do factor de transcrición STAT1 en células do sistema inmune (excluídas as células T). Os microdominios *raft* e tamén as caveolas están implicados na sinalización a través deste receptor.

## 6. CD26

CD26 é unha glicoproteína integral de membrana de 105-110 kDa aproximadamente, con actividade Dipeptidil Peptidasa IV (DPPIV, EC 3.4.14.5) (Torimoto *et al.*, 1992). Só é cataliticamente activa como dímero. Desde o punto de vista estrutural, ten un dominio intracelular moi pequeno e conservado, a diferenza do seu dominio extracelular e a rexión hidrófoba que os une. A porción extracelular consta de 4 dominios: un flexible de 20 aminoácidos, unha zona moi glicosilada, unha rexión intermedia fortemente conservada e rica en Cys, (responsable dos sitios de interacción con ADA, fibronectina e coláxeno) e por último, un segmento catalítico C-terminal de 250 aa (Fleischer, 1994; Morimoto & Schlossman, 1998). Ten unha vida media de aproximadamente 55 horas (Dobers *et al.*, 2000). A súa función principal é catalizar a ruptura de dipéptidos que conteñan a secuencia X-Pro no seu extremo N-terminal (Kenny *et al.*, 1976) que é difícil de procesar para outras proteasas, daí que CD26 sexa un factor limitante á hora de degradar péptidos que conteñan a devandita secuencia.

## 6.1. *EXPRESIÓN DE CD26*

CD26 está amplamente distribuída nos tecidos humanos (e tamén murinos), existindo tamén unha forma soluble (sCD26) que se detecta no plasma. A maior concentración desta proteína dáse na membrana de borde en cepillo das células epiteliais dos túbulo corticais do ril, e tamén é abundante nos conductos pancreáticos e nas microvellosidades do epitelio intestinal, así como na membrana plasmática de moitos outros tipos celulares, como células T, B e NK (Hartel *et al.*, 1988; McCaughan *et al.*, 1990; Dinjens *et al.*, 1989).

Os linfocitos en repouso presentan niveis baixos de CD26 (arredor do 56% en células CD4<sup>+</sup> e 35% en CD8<sup>+</sup>) e a súa expresión vese aumentada (ata un 80% nas CD4<sup>+</sup> e 12-19% nas CD8<sup>+</sup>) como consecuencia de procesos de activación con antíxenos, anti CD3 ou mitóxenos como PHA (Dang *et al.*, 1990; Gerli *et al.*, 1996; Kähne *et al.*, 1999; Cordero *et al.*, 2001b; Gorrell *et al.*, 2001), polo que se considera como un marcador de activación/memoria inmunolóxica. Existe tráfico desde o “pool” de moléculas intracelulares de CD26 ata a superficie celular (só este CD26 presente na membrana está implicado en procesos de activación de linfocitos) e tamén do CD26 superficial que entra na célula polo aparato de Golgi, producíndose glucosilacións nas moléculas, que darían lugar ás distintas formas de CD26 durante a activación dos linfocitos T (Fan *et al.*, 1997).

CD26 considérase un antígeno sen linaxe celular cúa expresión está regulada durante o proceso de activación e diferenciación das células inmunes. Non aparece de partida en células B nin en NK, pero xorde por estimulación destes leucocitos (Bauvois *et al.*, 1999). Nas PBMCs, só unha pequena poboación expresa CD26, (Vanham *et al.*, 1993), presentando un fenotipo CD45RO<sup>+</sup> de memoria tardía. Esta poboación é responsable da produción da maior parte da IL-2 (que se ve aumentada polo entrecruzamento con CD3) e outras citoquinas Th1

(Willheim *et al.*, 1997), un feito conectado coa produción de IL-12 polas APCs, xa que esta citocina aumenta a expresión e a función DPPIV de CD26 en PBMCs estimulados con PHA (Cordero *et al.*, 1997). Estas células CD26<sup>high</sup> poden ser CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, posúen capacidade de migración transendotelial e quimiotaxe cara zonas inflamatorias (Mizokami *et al.*, 1996; Hühn *et al.*, 1999) e son moi importantes para a síntese de Igs por parte das células B. Ademais de marcador de memoria, CD26 exprésase maioritariamente en células Th1.

### **6.2. FUNCIONS**

Pódense resumir as funcións de CD26 en 3 principais: 1) actividade peptidasa sobre distintos substratos; 2) unión á matriz extracelular; 3) unión a ADA e control dos niveis de adenosina e 4) interacción célula-célula e transdución de sinais cara o interior da célula. Todas elas están relacionadas coa proliferación e aumento da resposta celular a estímulos externos e a quimiotaxe (Boonacker & van Noorden, 2003).

#### **6.2.1 Actividade enzimática**

As dianas da actividade enzimática desta proteína son moitas e moi variadas: citocinas, factores de crecemento, neuropéptidos, etc. A súa actividade enzimática afecta a péptidos importantes no sistema inmune como as interleucinas 2, 5, 6, 10 e 13, a eritropoietina, o PGL-1, CCL-5/RANTES e outras moitas, modulando o tempo que poden ser activos. Trátase de substratos de pequeno tamaño, xa que CD26 non pode degradar péptidos grandes. Parece ter dianas fóra do sistema inmune (Nauck *et al.*, 2009), como por exemplo a prolactina, a hormona do crecemento ou o *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), implicado no mantemento da homeostase da glucosa (Marguet *et al.*, 2000).

Os estudos sobre a actividade biolóxica da DPPIV leváronse a cabo utilizando os múltiples inhibidores específicos que se desenvolveron fronte a esta enzima. A inhibición da actividade DPPIV en cultivos de

linfocitos T provoca a supresión da produción de IL-2, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ , estimulando a produción de TGF- $\beta$ 1, o que provoca unha inhibición da proliferación celular (Reinhold *et al.*, 1997). Isto levou a que os inhibidores da DPPIV se probaran con éxito en terapias inmunosupresoras (Yazbeck *et al.*, 2009).

CD26 tamén ten un papel importante na entrada do VIH nos linfocitos T. Estes pacientes teñen unha menor porcentaxe de células CD26<sup>high</sup>, que xogan un papel crucial na resposta inmune logo da exposición a un antíxeno. CD26 altera a capacidade de quimioquinas como CCL-5 (RANTES) e CXCL-12 (Gorrell *et al.*, 2001) de inhibir o VIH, o que implica unha menor produción de IL-2 que conleva un deterioro na función inmune destes pacientes, estando suprimida a vía de sinalización mediada por CD26 (Blázquez *et al.*, 1992; Ohtsuki *et al.*, 2000).

### **6.2.2 Asociación coa matriz extracelular**

Outra das funcións importantes de CD26 é a súa asociación coa matriz extracelular uníndose ó coláxeno ou á fibronectina, acentuando así a migración celular (Dang, 1990), aínda que o papel de CD26 como molécula de adhesión non está de todo claro (Morimoto & Schlossman, 1998).

### **6.2.3 Interacción CD26-ADA**

CD26 interacciona mediante os seus dominios extracelulares con varias proteínas, entre as que destaca a enzima adenosina deaminasa (ADA) (Morrison *et al.*, 1993; Kameoka *et al.*, 1993). De feito CD26 coñécese tamén como proteína de unión a ADA ou ADAbp. ADA é unha enzima principalmente citosólica presente en tódolos tecidos de mamíferos e cun importante papel no desenvolvemento e función do tecido linfoide (Van der Weyden & Kelley, 1976; Hovi *et al.*, 1976), xa que cataliza a desaminación irreversible da adenosina e de

2'-desoxiadenosina dando lugar a inosina e 2'-desoxiinosina respectivamente. ADA humana ten 2 isoformas, corta e larga, sendo esta última a que se une a CD26 na superficie celular. A carencia xenética de ADA provoca inmunodeficiencia combinada severa, caracterizada pola ausencia de linfocitos T e B, probablemente pola acumulación de metabolitos tóxicos para a célula.

A unión entre CD26 e ADA realízase nunha rexión do dominio rico en cisteínas, pero hai outros aminoácidos fóra dela que tamén parecen ser importantes. Cando se forma este complexo, consérvase a actividade enzimática de ambas proteínas (Dong *et al.*, 1996).

A maioría de ADA é intracelular, pero existe un 10% extracelular podería estar implicado na inhibición mediada por citoquinas, do mesmo xeito que podería estarlo CD26 ó ser unha proteína de unión a ADA só na membrana (Franco *et al.*, 1997). Ademais, a expresión de ADA en PBMCs está aumentada pola activación con mitóxenos, ó igual que ocorre con CD26 (Martin *et al.*, 1993).

Parece que a unión ADA-CD26 regula os niveis extracelulares de adenosina, que é unha molécula inhibidora para os linfocitos T de xeito dose-dependente (de Meester *et al.*, 1994). Polo tanto, a actividade de ADA parece ter tamén funcións coestimuladoras (Martin *et al.*, 1995) e a asociación ADA-CD26 está relacionada coa capacidade do linfocito T para producir citoquinas Th1 (como o IFN- $\gamma$ , IL-6 ou TNF- $\alpha$ ) e de proliferar en resposta á estimulación con anti CD3 (Martin *et al.*, 1995; Pacheco *et al.*, 2005). De feito, a inhibición de ADA con deoxicoformicina bloquea este efecto coestimulador e interfere na produción de IL-2 e na expresión de IL-2R mediadas por lectinas.

En contraste con isto, outros autores como Dong *et al.* sosteñen que a influencia de ecto-ADA na proliferación das células T só ocorre en presenza de adenosina. Ecto-ADA (ADA presente na superficie celular) pode estimular a proliferación de células CD4<sup>+</sup> inducida por anti-CD3



incluso en presencia de inhibidores de ADA, indicando que se trata dun mecanismo independente da súa actividade enzimática (Martin *et al.*, 1995). Ademais, a incubación de células T con ADA esóxena fai aumentar os niveis de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, o que supón que ADA inicia eventos de sinalización (Franco *et al.*, 1998). Comprobouse por outra parte que o tratamento con anticorpos anti-CD26 que bloquean os sitios de unión de ADA, teñen un efecto coestimulador (xunto con anti-CD3) na proliferación de células T, co que a unión ADA-CD26 non sería un requisito indispensable para a coestimulación (DeMeester *et al.*, 1995). Ecto-ADA ten, ademais de CD26, outras proteínas de anclaxe como son o  $\text{A}_1\text{R}$  (*Adenosine receptor type 1*) e  $\text{A}_{2\text{B}}\text{R}$ , ós que se asocian proteínas G que poden transducir sinais ó interior celular. Dos traballos anteriores, dedúcese o controvertido papel da interacción CD26-CD45RO na coestimulación de células T.

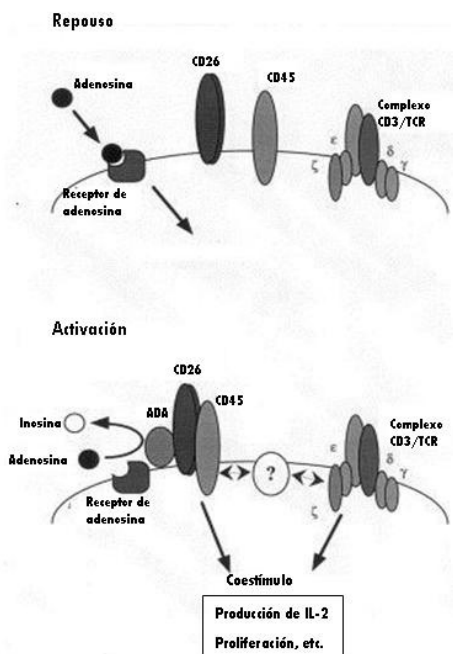
#### **6.2.4 Interacción célula-célula e transducción de sinais: caveolina 1, CARMA-1 e CD45RO**

Os mecanismos de transducción de sinal iniciada por CD26 na superficie celular non están totalmente caracterizados. Estas rutas implican a mobilización de calcio intracelular e van seguidas dun aumento de proliferación. No proceso resultan fosforiladas proteínas que tamén son substratos da sinalización vía TCR (a propia cadea  $\zeta$  do TCR, p56lck, ZAP-70, MAPK, etc), evidenciando as conexións entre CD26 e a vía de sinalización TCR/CD3. De feito, é necesario que se exprese este complexo, en concreto a cadea  $\zeta$ , e que os ITAMs (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) estén activos para para que CD26 sexa funcional (Bednarczyk *et al.*, 1991; Hegen *et al.*, 1997).

Este feito, unido ó pequeno tamaño do dominio intracelular de CD26, carente de motivos comúns de sinalización, indica a necesidade dunha proteína adaptadora (ou ben da asociación con proteínas que só

teñían dominios intracelulares funcionais), xa que parece que CD26 non se asocia directamente á cadea  $\zeta$ , tal como se observa na Figura 7.

**Figura 7. Posibles papeis de CD26 na activación de células T.** En repouso, un único estímulo vía TCR/CD3 non é suficiente para a activación. Na activación de células T mediada por CD26, á parte do estímulo TCR/CD3 existe outro sinal transmitido polo CD45 asociado a CD26.



Así, CARMA-1 (*caspase recruitment domain-containing membrane associated guanylate kinase protein-1*) é unha molécula asociada constitutivamente a *rafts* lipídicos que se une á cola citoplasmática do dímero de CD26, o que leva ó inicio da cascada de transdución de sinal orixinada por CD26 e ós seus efectos coestimuladores (Ohnuma *et al.*, 2008). CARMA-1 actúa como un regulador da activación do factor de transcripción NF- $\kappa$ B inducida polo TCR e da estimulación vía CD28 dependente da activación por Jnk (Gaide *et al.*, 2002).

O papel de CD26 sobre a sinalización TCR depende só en parte da súa actividade DPPIV. As asociacións inducibles desta molécula tamén

poderían influir no proceso de activación da célula T (Steeg *et al.*, 1995). Deste xeito, CD26 tamén se asocia á isoforma RO (de baixo peso molecular) de CD45, sobre todo en células de memoria (Torimoto *et al.*, 1991; Salgado *et al.*, 2000), podendo ser o inicio de vías de transdución de sinal (Torimoto *et al.*, 1991). Esta interacción podería afectar ás PTKs, á fosforilación de CD3 e á mobilización de calcio observada cando CD26 actúa como molécula coestimuladora. Parece, pois, que hai un solapamento entre CD26 e a ruta de transdución de sinal do TCR, orixinando un efecto coestimulador que dá lugar á activación e translocación do factor de transcrición NF- $\kappa$ B. É o caso das APCs, onde CD26 reconece a caveolina-1 na superficie e esta interacción activa a NF- $\kappa$ B (vía CARMA-1), o que se traduce na activación da célula (Ohnuma *et al.*, 2004).

Todos estes datos dan idea da complexidade de efectos que pode ter CD26 na modulación do sistema inmune (Ohnuma *et al.*, 2008), e neste sentido hai que destacar que a actividade de CD26 non se reduce unicamente a degradar certas moléculas (o procesamento dos substratos pode aumentar ou reducir a actividade dos mesmos, segundo o caso), senon que intervéen directamente no proceso de transdución de sinal, regulándoo en certa medida ou presentando actividade coestimuladora (de xeito dependente ou independente da súa actividade enzimática) (Dang *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1993; De Meester *et al.*, 1995). Con isto quérese dicir que CD26 non é capaz de activar as células T por si mesmo pero si o fai amplificando o sinal vía TCR. As características coestimuladoras de CD26 tradúcense nun aumento da resposta das células T fronte antíxenos estraños, o inicio da transdución de sinal, un incremento na produción de citocinas e doutros marcadores de activación (como CD25, CD71 ou CD69) e a indución da diferenciación en células efectoras (Morimoto & Schlossman, 1998).

### 7. CD45

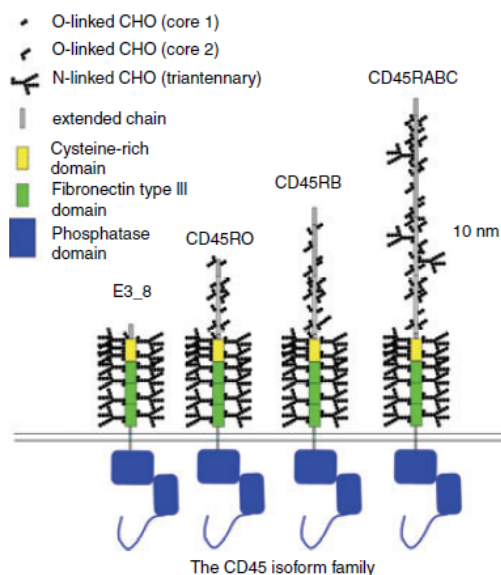
CD45 é unha proteína tirosina fosfatasa que tamén se denomina Antíxeno Leucocitario Común ou LCA (EC 3.1.3.48), descrita por primeira vez por Thomas en 1989, cun papel moi importante na regulación das cascadas de transducción de sinais en células do sistema inmune. Trátase dunha glicoproteína moi abundante na superficie celular. O dominio extracelular ten de 391 a 552 aminoácidos e a súa lonxitude depende de ata 5 combinacións coñecidas e 8 potenciais combinacións de corte e empalme, que se xeneran durante a maduración do mRNA de CD45. A rexión transmembrana é de 22 Aa e a citoplasmática ten 705 Aa, con dous dominios estruturais denominados D1 e D2, duns 300 Aa cada un, dos que só D1 ten actividade enzimática, sendo necesario para a sinalización vía TCR. Non se coñece polo momento a función de D2, pero ambos son necesarios para o funcionamento óptimo do enzima.

#### 7.1 ISOFORMAS

CD45 exprésase só en células nucleadas hematopoiéticas. O xen que o codifica pode dar lugar a varios produtos xénicos como consecuencia do procesamento alternativo de tres exóns denominados A, B e C, que codifican para unha rexión do dominio extracelular cercana ó extremo N-terminal. As reorganizacións do mRNA de CD45 poden dar lugar a tres isoformas que conteñen algún dos exóns (RA, RB ou RC), dous (RAB, RAC ou RBC), tres (RABC) ou ningún (RO) (Hermiston *et al.*, 2003).

CD45 atópase moi N-glicosilado no seu dominio extracelular, e presenta sitios de O-glicosilación variables nos exóns. O patrón de glicosilacións de CD45 orixina diferentes isoformas que abranguen tamaños desde 180 kDa (RO) ata 240 kDa (RABC) e que se distinguen tamén pola súa forma e carga negativa (ver Figura 8). Este patrón depende tanto dos exóns variables como do tipo celular, do estado de

desenvolvemento e do estado de activación da célula, o que dá idea da súa importancia (Thomas, 1989).



**Figura. 8. Estructura das 4 isoformas de CD45 en mamíferos.** Trátase dun modelo no que a asignación dos glicanos non é categórica (de Holmes, 2006)

Existen factores *cis* e *trans* que regulan o procesamento alternativo do dominio extracelular de CD45. En relación co estado de activación da célula, a expresión de isoformas de maior tamaño ( $RA^+$ ) dáse en linfocitos T naïve (Smith *et al.*, 1986; Picker *et al.*, 1993). Trala estimulación das células con mitóxenos ou aloantíxenos, a expresión de CD45RA vai decrecendo e sendo substituída nos seguintes días pola isoforma RO (a de menor tamaño) (Birkeland *et al.*, 1989; Deans *et al.*, 1989). Sábese que no cambio de isoforma RA a RO inflúe a activación da proteína quinasa C e Ras, alteracións no mRNA, así como a síntese de proteínas *de novo* (Lynch & Weiss, 2000).

A isoforma RO está presente en aproximadamente o 40% dos PBMCs en repouso, incluíndo as subpoboacións  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , na maioría dos timocitos e nos linfocitos T activados (Norton *et al.* 1986; Akbar *et al.*, 1988). Tamén se expresa en monocitos, macrófagos e granulocitos. Cando eses linfocitos T activados son reestimulados, as

células que teñen unha resposta secundaria (ou células T de memoria) son CD45RO<sup>+</sup>.

As distintas isoformas de CD45 teñen idéntica actividade PTPasa *in vitro*. Parece que o tallo citoplasmático é suficiente para restaurar a sinalización vía TCR (Hermiston *et al.*, 2003), suxerindo que a actividade enzimática é independente das variantes extracelulares de CD45, o que non exclúe un rol para o dominio extracelular *in vivo*. En liñas de células T transfectadas con cDNAs das distintas isoformas de CD45, ou en células de ratos *knock-out* transxénicos, víronse diferencias na resposta ós antíxenos, o que dá idea da importancia funcional das isoformas.

Como xa se comentou, a diversidade das estruturas e tamaños das isoformas de CD45 dependen do tipo celular. Logo da activación, as células pasan de ser T naïve, que expresan isoformas con epitopos A/B/C con modificacións post-traduccionais (O e N-glicosilación), a T de memoria ou T efectoras, nas que aparece a forma de menor peso molecular, CD45RO, que carece das secuencias codificadas polos exóns 4/A, 5/B e 6/C (Sasaki *et al.*, 2001).

Este cambio de isoformas trala activación vén acompañado dun aumento da actividade enzimática PTPasa (Salgado *et al.*, 2003). O proceso pode verse influenciado por citoquinas como IL-12, que paradoxicamente produce unha redución no número de moléculas CD45RO<sup>+</sup> en linfocitos T activados aínda non aclarado.

CD45 tamén pode asociarse a outras proteínas como son Thy-1, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD26 e CD28 entre outras (Penninger *et al.*, 2001; Dustin *et al.*, 2001). Hai que ter en conta que ó ser unha proteína moi abundante, aumenta a probabilidade de asociacións aleatorias. Outras proteínas relacionadas con CD45 son LPAP (fosfoproteína de linfocitos asociada a fosfatasa), CD100, CD22 e galectina-1 (revisado en Hermiston *et al.*, 2003). A interacción con outras moléculas pode verse

afectada polas diferentes isoformas, ofrecendo diferentes posibilidades de interacción, xa que hai moléculas que interaccionan única ou preferentemente cunha determinada isoforma (por exemplo, CD26 con CD45RO).

O noso grupo comprobou que a actividade tirosín fosfatasa (PTP) de linfocitos aumenta na presenza de IL-12, sendo CD45 a principal responsable deste feito (Salgado *et al.*, 2003). Sen embargo, ó estudar os niveis de expresión de CD45RO en superficie por citometría de fluxo, víase claramente unha redución relacionada coa presenza de IL-12 no cultivo.

### **7.2 *FUNCIÓNS DE CD45***

A súa función principal é desfosforilar e desactivar as quinasas da familia Janus (como JAK1 e JAK3 en humanos), relacionadas cos receptores de citoquinas (Irie-Sasaki *et al.*, 2001), e, ó mesmo tempo, inducir a activación das quinasas da familia Src, encargadas de catalizar as primeiras reaccións de fosforilación posteriores ó acoplamento entre o TCR e o complexo MHC/antíxeno (Gervais *et al.*, 1993). De feito, CD45 foi identificado como un regulador positivo da sinalización vía receptores de antíxeno. (Pingel & Thomas, 1989; Koretzy *et al.*, 1990; Volarevic *et al.*, 1993; Hovis *et al.*, 1993). Ademais, e do mesmo xeito que ocorre con ADA, a deficiencia de CD45, tanto en ratos como en humanos, provoca inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (Kung *et al.*, 2000).

CD45 tamén incrementa a mobilidade celular facilitando as interaccións transitorias entre as células e limitando as adhesións duradeiras non desexadas (Wong *et al.*, 2008).

### 7.2.1 Transducción de sinal

A cascada de transducción de sinal vía TCR iníciase pola unión do receptor da célula T (TCR) co péptido antixénico presentado polas moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), que desembocará na activación da célula T. O primeiro paso é a activación de Lck e Fyn, tirosín quinases da familia Src (SFKs, *Src Family Kinases*) que fosforilan os ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) das cadeas  $\zeta$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ , e  $\gamma$  do complexo CD3/TCR. Os ITAMs fosforilados en 2 sitios activan a proteína tirosín quinasa (PTK) ZAP-70, o que leva a unha fosforilación das proteínas adaptadoras e enzimas que facilitan a estimulación das rutas de sinalización subseguintes e que rematan na transcripción de novos xenes, na reorganización do citoesqueleto, na produción de citoquinas e na proliferación, a fin de contas, na activación da célula T (revisado en Latour & Veillette, 2001; Kane *et al.*, 2002).

As SFKs, responsables do inicio da resposta inmune en células T e B, son o substrato primario de CD45 (Ashwell & D'Oro, 1999; Thomas & Brown, 1999). En concreto, as súas dianas son p56<sup>Lck</sup> (Lck) e p59<sup>Fyn</sup> (Fyn). Fálase dun dobre papel regulador para CD45 (McNeill *et al.*, 2007), xa que fosforila os residuos Y394 en Lck e Y397 en Lyn, reguladores positivos da actividade quinasa, e, por outra parte, fosforila Y505 e Y508 dos dominios C-terminais de Lck e Lyn respectivamente, con función reguladora negativa (Saunders & Johnson, 2010). Unha vez producido o acoplamento MHC-antíxeno, CD45 cesa a súa actividade PTPasa (Hegedus *et al.*, 1999).

Ademais, CD45 pode regular negativamente a activación dos receptores de interferón e de citoquinas mediante a desfosforilación das JAK quinases. Estas funcionan como reguladores positivos da sinalización de citoquinas, xa que fosforilan ós membros da familia STAT. As STATs fosforiladas son translocadas ó núcleo e regulan a expresión



de xenes involucrados na resposta a citoquinas e quimioquinas. En ratos CD45<sup>-/-</sup> a eritropoiese dependente de citoquinas viuse aumentada, xunto cunha hiperfosforilación de JAK2 e as STATs 3 e 5 (Irie-Sasaki *et al.*, 2001).

### 7.2.2 Control da actividade enzimática

A actividade PTPasa de CD45 ten un dobre papel regulador positivo e negativo da sinalización da célula T que pode controlarse a través de varios mecanismos (Majeti *et al.*, 2000):

- interaccións diferenciais con ligandos; en concreto a través do dominio rico en cisteína do dominio extracelular de CD45, que é análogo ó do EGFR (*epidermal growth factor receptor*).

- homodimerización espontánea entre isoformas, que impediría o acceso ó centro activo do enzima do substrato que ha ser desfosforilado. Baseado neste último mecanismo propúxose un novo modelo de control da actividade PTPasa de CD45: a molécula estaría en equilibrio entre a forma monomérica e dimérica para todas as isoformas. A actividade PTPasa total estaría controlada en función das isoformas que se expresan. Así, se hai unha maior cantidade de fenotipo RA<sup>+</sup>, haberá máis monómeros (debido ás cargas negativas), o que está apoiado por estudos con FRET nos que se viu que nas células en repouso o CD45 existe principalmente como monómero. Na fase inicial da activación da célula T aumentaría a actividade de CD45, para facilitar a sinalización vía TCR e os eventos da resposta inmune primaria. Deste xeito, e debido á lenta reciclaxe da molécula en superficie, as isoformas RA convírtense en RO, que dimerizan máis rapidamente (Hermiston *et al.*, 2009).

Unha hipótese alternativa é a de McNeill *et al.*, 2007, que observaron que o aumento da actividade PTPasa está relacionado directamente co incremento da súa expresión e non con procesos de dimerización. Por outro lado, tampouco se pode afirmar a existencia dunha relación directa entre os niveis de CD45 e a sinalización vía TCR.

Cando a célula presenta baixos niveis de CD45, a sinalización é débil. Sen embargo, con niveis intermedios de CD45, obsérvase unha hiper resposta do TCR.

Finalmente, a compartimentalización ou situación relativa do encima con respecto ó substrato podería constituír un nivel de regulación adicional da actividade enzimática de CD45.

### 7.3 LOCALIZACIÓN

Como xa se comentou, CD45 é unha molécula moi abundante na superficie da célula, pero tamén existe no interior celular. A localización celular e o acceso ós substratos contribúen á función de CD45. Observouse que o *pool* intracelular de CD45 se redistribuíu logo da activación celular (Minami *et al.*, 1991).

CD45 está ausente na sinapse inmunolóxica durante os momentos posteriores ó acoplamento entre o TCR e o complexo ligando/MHC, o que provoca que proteínas como Lck, LAT e o TCR estén fóra do alcance da súa actividade enzimática. Esta ausencia é predecible debido ó gran tamaño de CD45 (Shaw & Dustin, 1997) pero noutros traballos, pola contra, detectouse a súa presenza no contacto entre a célula T e a APC (Sperling *et al.*, 1998). Neste sentido, certos estudos detectaron CD45 asociado debilmente a *rafts* lipídicos en células T humanas, un tipo de microdominios conectados coa sinapse inmunolóxica (Montixi *et al.*, 1998; Ilangumaran *et al.*, 1999). Sen embargo, outros autores (Johnson *et al.*, 2000) postulan que nun primeiro momento, en células T sen activar, CD45 está fóra da zona raft para logo migrar ó centro da mesma, pero separado do TCR, mentres que outros sosteñen que é a propia activación do TCR a que promove a agregacións dos *rafts* e o recrutamento de proteínas características destes dominios (como Lck ou CD45) (Rodgers & Rose, 1996). As diferencias nos resultados poden

dependen de múltiples factores, como o estado de activación celular, o tipo de liña celular ou os problemas das técnicas para estudos con *raft*.

A distribución de CD45 na superficie do linfocito T pode verse alterada non só pola activación vía TCR, senón tamén por moduladores como as citoquinas. Así, IL-12, unha das principais causantes da polarización cara o fenotipo Th1 durante a resposta inmune, incrementa a actividade enzimática DPPIV e os niveis de CD26 en linfocitos T activados (Cordero *et al.*, 1997; Salgado *et al.*, 2000), ademais de potenciar a migración de CD45 fóra da zona raft logo da activación con mitóxenos do tipo PHA (Salgado *et al.*, 2003). Este feito semella importante para a activación das MAPK (Zhang *et al.*, 2005).

Dacordo coa hipótese máis extendida (a presenza de CD45 en *rafts*), se CD45 non leva a cabo a súa actividade enzimática desfosforilante, bloquéase a cascada de activación. Unha vez producida a desfosforilación, CD45 ten que alonxarse das proteínas Src para así inactivar o sinal, probablemente alonxándose dos *raft* onde ten lugar a sinapse inmunolóxica.



# Obxectivos



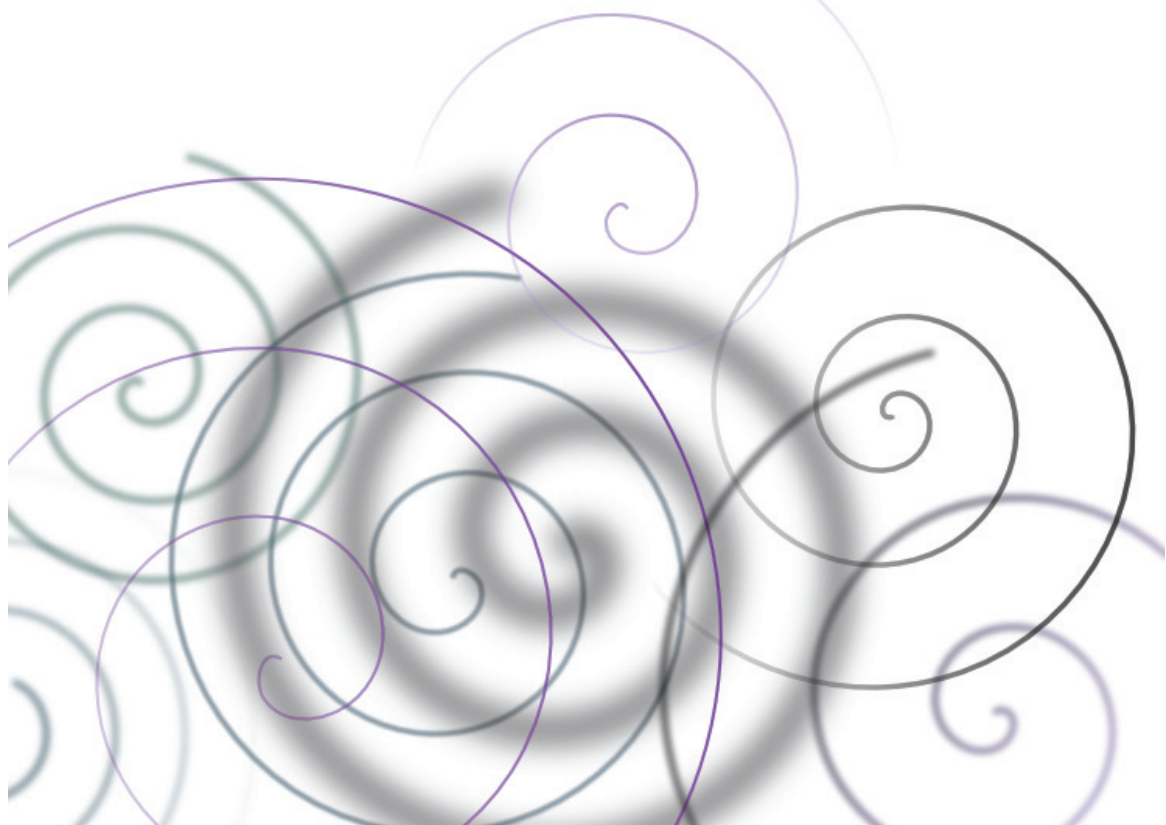


1. Determinar se a intensidade do estímulo primario vía receptor da célula T (TCR), e a coestimulación con distintas citoquinas (IL-12, IL-2, IL-4, TNF $\alpha$ ), altera os niveis de CD45RO na superficie de células mononucleares de sangue periférica humana.
2. Comprobar se adenosina deaminasa (ADA) esóxena, un encima do catabolismo de purinas presente na superficie dos linfocitos T activados, ten algún tipo un efecto sobre a densidade de CD45RO na membrana das células.
3. Estudiar se a presenza de CD45RO nos *rafts* lipídicos é dependente da intensidade da activación a través do TCR e da modulación do sinal primario mediada por distintas citoquinas (IL-12, IL-2, IL-4, TNF $\alpha$ ) ou ADA esóxena.
4. Caracterizar en PBMCs activadas se existe coordinación entre os niveis de expresión de CD45RO e os da proteína asociada CD26.
5. Analizar se CD26 é unha molécula importante para o control da densidade de moléculas de CD45RO na superficie das PBMCs activadas.
6. Verificar se existe algún tipo de relación entre a taxa de proliferación celular, o fenotipo efector/regulador dos linfocitos T e os niveis de CD26 e CD45RO.





# Material e Métodos





## 1. EXTRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

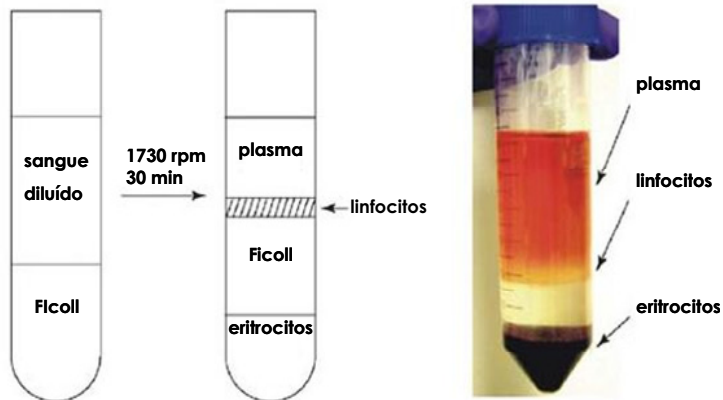
A obtención de células mononucleares de sangue periférico ou PBMCs realizouse a partir de concentrados leucocitarios (*buffy coats*, cedidos polo Centro de Transfusión de Galicia), procedentes de doantes sanos utilizando a técnica de separación mediante gradientes de densidade por centrifugación diferencial sobre Ficoll®, seguindo unha modificación do método descrito por Böyum (Böyum, 1968). Este método aproveita características celulares como densidade e tamaño para levar a cabo a separación.

Neste traballo utilizouse Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare), cunha densidade de 1,078 g/ml que permite a separación das células mononucleares (linfocitos e monocitos) do resto de células sanguíneas con diferente flotabilidade. 20 ml dos *buffy coats* diluídos, debido á súa alta concentración, 1:3 en RPMI-1640 (Sigma) foron depositados cuidadosamente sobre 10 ml de Ficoll-Paque PLUS a 20°C (temperatura á que a densidade do Ficoll é óptima para a separación), evitando a mestura de ambas fases e posteriormente foron centrifugados a 1730 rpm (Beckman G6R, rotor balanceado) durante 30 min a 20°C sen freno. Durante a centrifugación, as diferentes células sanguíneas migran de xeito característico, quedando situadas en distintas capas do gradiente resultante.

Así, tal e como se amosa na Figura 9, no fondo do tubo deposítanse principalmente os eritrocitos, e por encima deles aparece unha banda correspondente ó Ficoll. Os linfocitos-monocitos (PBMCs) que se van extraer aparecen nunha banda ben definida na interfase entre o plasma e o Ficoll, debido á súa baixa densidade. Por último, na capa superior localízanse o plasma e as plaquetas, que se eliminan cuidadosamente para extraer a banda de interese. As células da banda de PBMCs lávanse dúas veces con RPMI a 1250 rpm, 20°C, 10 min.

### 3. Material e métodos

Todo o proceso de extracción foi levado a cabo nunha campá de fluxo laminar para garantir a esterilidade do proceso.



**Figura 9. Esquema e imaxe real dunha separación sanguínea por gradientes de Ficoll.**

Unha vez lavadas as células foron contadas, comprobando de forma rutinaria que a súa viabilidade fose sempre superior ó 95%. Esta determinación foi levada a cabo polo método de exclusión de azul tripán, colorante incorporado unicamente polos linfocitos non viables (con danos na membrana plasmática). Tomando un volume coñecido de células, diluíuse 1:2 en azul tripán (0.1% peso/volume de azul tripán en PBS) e a continuación fíxose unha dilución 1:20 en RPMI. As células contáronse nunha cámara Neubauer, empregando un microscopio óptico invertido (Wilovert, Will-Welzlar). A cuantificación de viabilidade realizouse do seguinte xeito:

$$Viabilidade = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ células vivas} + n^{\circ} \text{ células mortas}} \times 100$$

## 2. CULTIVO CELULAR

As condicións de cultivo celular foron variando segundo o plantexamento de cada experimento. O medio de cultivo utilizado, salvo no caso dos experimentos de interferencia, foi RPMI-1640 (Sigma), suplementado cun 10% de soro bovino fetal (FBS) (Biowhittaker; inactivado a 56°C durante 30 min), 100 µg de estreptomicina e 100 UI/ml de penicilina (Sigma). O medio de cultivo con FBS e antibióticos é o que se denominará a partir de agora medio completo.

As células T foron activadas con diferentes estímulos específicos para estes linfocitos, e con distintas concentracións segundo se indica en cada experimento. O máis común foi a utilización da lectina PHA-P (fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*, Sigma). Esta lectina é un mitóxeno que estimula a activación dos linfocitos T debido a que provoca a sinalización, entre outras, a través da vía TCR (receptor de células T), o que deriva na súa proliferación policlonal. Tanto a PHA como outros mitóxenos de tipo policlonal activan máis dunha vía de transducción de sinal, xa que interaccionan con varias moléculas na superficie celular. Nalgúns experimentos foi necesario engadir coestímulos como distintas interleuquinas (IL-12, IL-2, IL-4, TNF $\alpha$ ), enzimas como adenosina deaminasa (ADA), ou moléculas como metil- $\beta$ -ciclodextrina ou RNA interferentes, en diferentes condicións, tempos e concentracións, que se detallan en cada experimento.

As condicións xerais de cultivo desenvolvéronse durante 5 días como máximo (en función do experimento) nun incubador estéril (Heraeus BB16) a 37°C e un 5% de CO<sub>2</sub>. Transcorrido este tempo, as células foron recuperadas por centrifugación a 1250 rpm, 4°C, 10 min (Beckman G6R, rotor balanceado) e lavadas un mínimo de 2 veces con PBS frío, para eliminar os restos do medio de cultivo. O criterio de viabilidade tomado foi o mesmo que no apartado anterior.

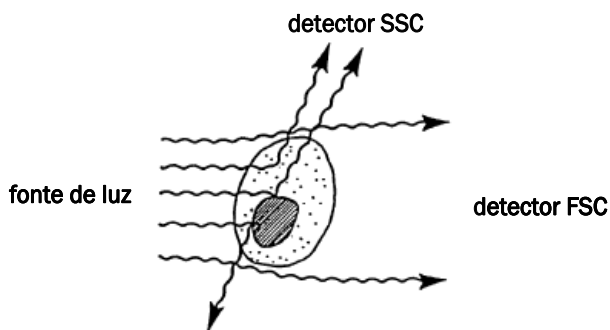
## **3. CITOMETRÍA DE FLUXO**

A citometría de fluxo é unha técnica de análise multiparamétrico que permite a cuantificación de compoñentes ou características estruturais das células. Aínda que as medicións son realizadas sobre células individuais e por unidade de tempo, permite procesar miles de células en poucos segundos, podendo así realizar un amplo estudo estatístico dos datos e conferíndolle á técnica moita solidez. A citometría de fluxo permite realizar diferentes tipos de ensaios, como medida da proliferación celular, contido en ácidos nucleicos, separación de tipos celulares, análise do ciclo celular, estudos de actividade enzimática, etc. ou a detección de antíxenos na superficie ou no interior da célula mediante o uso de anticorpos marcados directa ou indirectamente con fluorocromos. Esta última función permite caracterizar subpoboacións linfocitarias, e é amplamente usada en clínica para o diagnóstico de inmunodeficiencias, leucemias ou enfermidades autoinmunes, entre outras.

Un citómetro de fluxo filtra, amplifica e detecta as emisións de fluorescencia, dentro de determinados intervalos de lonxitude de onda, procedentes de partículas aliñadas dunha en unha que se cruzan cun feixe de luz láser encargado da excitación das moléculas fluorescentes. Da interacción da luz con cada partícula prodúcese un cambio na dirección da luz en todas as direccións do espazo, que será recollido polos detectores que os convertiran en sinais electrónicos que darán información sobre varios parámetros.

As características morfolóxicas que determinan a dispersión da luz son fundamentalmente o tamaño e a complexidade celular (membrana, núcleo, material granular dentro da célula, etc). Dentro dos parámetros detectables polo citómetro atópanse a dispersión frontal (FSC) e lateral (SSC) do láser empregado na excitación dos fluorocromos. A dispersión dá unha idea da morfoloxía das células analizadas, de xeito que a FSC

(luz dispersada nun pequeno ángulo, que case coincide coa dirección da luz incidente) dá unha medida do tamaño das célula ó ser proporcional ó tamaño da partícula que produce a dispersión. A SSC (luz dispersada en ángulo recto), pola outra banda, é directamente proporcional á súa complexidade interna, aumentando coa presenza de vacuolas, retículo endoplasmático, vesículas de Golgi, etc. Á hora de analizar os datos adquiridos polo citómetro, a representación gráfica de FSC e SSC permite unha diferenciación clara da(s) poboación(s) que nos interesan dentro da totalidade dos datos, permitindo descartar as que proceden de restos celulares, agregados do medio extracelular ou células apoptóticas que poden afectar ós resultados da análise.



**Figura 10.**  
**Dispersión lateral e frontal.** O feixe de luz incide na célula individual e dispérsase lateral e frontalmente tal como se representa na figura.

Ademais das medidas de dispersión, o citómetro pode detectar a emisión de fluorescencia de distinta lonxitude de onda procedente de diferentes fluorocromos, o que permite medir a cantidade de determinadas moléculas presentes nas células. Os fluorocromos son moléculas químicas que absorben luz a unha determinada lonxitude de onda e emiten a outra diferente (maior que a de absorción, polo tanto de menor enerxía). Caracterízanse polos seus espectros de excitación e de emisión, polo que a súa utilización está condicionada polo tipo de láser de que dispoña o citómetro e da lonxitude de onda á que se exciten. Existen fluorocromos que se excitan/emiten en case todo o rango de

lonxitudes de onda. Moitos dos anticorpos utilizados en citometría de fluxo están conxugados con fluorocromos, sendo a intensidade de fluorescencia detectada polo citómetro directamente proporcional ó número de moléculas de anticorpo que están unidas ó antíxeno. A intensidade de fluorescencia tamén depende do propio fluorocromo, porque hai algúns que emiten con maior intensidade que outros. É importante realizar unha adecuada selección do fluorocromo dependendo das necesidades do experimento, tendo en conta que o seu espectro de absorción debe ser o máis cercano posible ó espectro de emisión do láser utilizado, que os espectros de absorción e de emisión do fluorocromo deben estar ben separados para unha correcta detección do sinal, que posúan un corto estado de excitación, que sexan fotoestables e que o tamaño do fluorocromo non faga insoluble o complexo que forma co anticorpo. Unha boa combinación de fluorocromos permite a detección e análise de varios parámetros de forma simultánea. Na presente tese utilizouse a citometría de fluxo para detectar, por exemplo, antíxenos tanto na superficie como no interior celular, para medir a resposta proliferativa e para avaliar a viabilidade celular.

#### ***3.1 MARCAJE EXTRACELULAR E INTRACELULAR***

Para detectar os antíxenos presentes na superficie de celular empregáronse anticorpos específicos que levaban unidos certos fluorocromos para permitir a súa detección por citometría de fluxo. Os linfocitos, cultivados durante 5 días, foron lavados con PBS pH 7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 11.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), centrifugando 2 veces a 1200 rpm durante 7 min a 4°C. Na maioría de experimentos medíronse os niveis de CD45RO e CD26. Para isto, utilizáronse os anticorpos monoclonais anti-CD45RO-PE, clon UCHL-1 (Pharmingen, BD), e anti-CD26-FITC, clon TP1/16 (purificado polo noso grupo de investigación), cos seus correspondentes isotipos control: IgG1-R-PE (Sigma) e IgG1-FITC, ambos de rato (Sigma). Realizáronse



triplicados de cada unha das condicións de cultivo, e a cada tubo de citometría, que contiña aproximadamente  $1 \times 10^6$  células, engadíuselle 1  $\mu$ l de cada isotipo (no caso dos controis negativos) ou 10  $\mu$ l de anti-CD45RO-PE e 0.25  $\mu$ l de anti-CD26-FITC (no caso dos controis positivos). Tras unha incubación de 30 min a 4°C e na oscuridade, as células foron lavadas 2 veces con 2 ml PBS, resuspendidas en 1 ml de PBS e mantidas a 4°C ata a súa lectura no citómetro.

Nalgúns experimentos de citometría, as células foron tratadas primeiramente con M $\beta$ CD (Metil-beta-ciclodextrina) antes da marcaxe fluorescente de CD45RO. A M $\beta$ CD é un composto capaz de introducir colesterol, unha molécula voluminosa e moi hidrofóbica, dentro dos seus aneis de ciclodextrina, eliminándoo da superficie das membranas, especialmente dos *rafts*, incrementando así a solubilidade destes microdominios en deterxentes non iónicos e alterando a expresión das proteínas residentes nestas rexións da membrana. Para estudar a resistencia ou a sensibilidade de CD45RO ó tratamento con M $\beta$ CD, as PBMCs foron activadas con PHA (2.5  $\mu$ g/ml)  $\pm$  IL-12 (2 ng/ml), e cultivadas durante 5 días a unha densidade inicial de  $0.5 \times 10^6$  células/ml. Transcorrido ese tempo, as células foron lavadas con RPMI e separadas en 2 alícuotas. A primeira delas foi tratada con M $\beta$ CD (2.5 mM) en PBS, durante 15 minutos a 37°C; a segunda foi manipulada nas mesmas condicións, pero cun volume igual de PBS. A continuación laváronse as células (1200 rpm, 4°C, 7 min), fixéronse con PFA (1% p/v; 15 minutos, temperatura ambiente) e volvéronse a lavar para marcalas de seguido con anti CD45RO-PE, tal e como xa foi descrito.

Nos experimentos con células reguladoras, os linfocitos foron extraídos e cultivados do mesmo xeito que se detalla nos apartados 1 e 2. Sen embargo, os protocolos de citometría presentaron algunhas diferencias con respecto á marcaxe de antíxenos en superficie descrita anteriormente xa que nestes experimentos fíxose necesaria a detección adicional de moléculas intracelulares como FoxP3. Os anticorpos

### 3. Material e métodos

---

utilizados foron: GAM-APC (BD Pharmingen), CD26-FITC (clons TP1/16 - purificado no noso laboratorio-, L272 -BD Immunocytometry Systems- e TP1/19 -Immunostep-), CD25-FITC, FoxP3-PE, CD4-PerCP, CD45RO-APC e CD127-PE (todos de BD Pharmingen). Para a marcaxe inicial das moléculas extracelulares (CD4, CD26, CD25, CD45RO, CD127), engadíronse 20  $\mu$ l de cada anticorpo por cada millón de células, ou os correspondentes isotipos, incubando posteriormente os tubos durante 30 minutos a 4°C a escuras. A continuación realizouse un lavado con 2 ml de tampón de lavado (BD *Pharmingen Stain Buffer*), sendo centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. Unha vez decantado o sobrenadante, as células foron fixadas engadindo 2 ml/tubo de tampón A (do kit Human FoxP3 Buffer Set, BD Pharmingen, seguindo as instrucións do fabricante), incubando durante 10 min a escuras e a temperatura ambiente (RT). O lavado realizouse con 2 ml de tampón de lavado (BD *Pharmingen Stain Buffer*), centrifugando posteriormente a 1600 rpm durante 5 min. A continuación, permeabilizáronse as células engadindo 0,5 ml/tubo de tampón C (dilución de tampón B e tampón A 1:50), e incubando 30 min en oscuridade a RT. Finalmente, as células foron sometidas a dous lavados con 2 ml de BD *Pharmingen Stain Buffer*, durante os cales foron centrifugadas a 1600 rpm durante 5 minutos. Por último, engadíronse os anticorpos necesarios para a detección de moléculas intracelulares (isotipo ou anti-FoxP3), sendo incubadas as células 30 min a RT en oscuridade. Unha vez lavadas (2 ml/tubo; BD *Pharmingen Stain Buffer*), as células foron centrifugadas a 1600 rpm durante 5 min. Logo de decantar, a fixación final das estruturas celulares realizouse con 1 ml de PFA 2% (p/v) durante 30 minutos a RT. As células laváronse finalmente con 2 ml de BD *Pharmingen Stain Buffer* (1600 rpm, 5 min) e resuspendéronse en 1 ml do mesmo tampón.

### 3.2 ANÁLISE DA PROLIFERACIÓN CELULAR

O CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) é unha molécula particularmente efectiva á hora de monitorizar as divisións celulares de linfocitos e doutros tipos celulares. Trátase dun composto que non é fluorescente no exterior da célula, pero que debido á súa gran permeabilidade é capaz de atravesar a membrana plasmática. Unha vez dentro da célula, as esterases intracelulares procesan os grupos acetato do CFSE, convertíndoo nunha molécula moi fluorescente que se une covalentemente cos grupos amino das proteínas. Unha pequena parte dos conxugados de carboxifluoresceína resultantes pode saír da célula e son rapidamente degradados. A maioría dos conxugados de carboxifluoresceína formados son moi estables e quedan no interior das células durante meses, pero repártense equitativamente entre as células fillas despois de cada división celular, o que permite monitorizar dita división mediante citometría de fluxo, xa que as células fillas terán a metade de intensidade de fluorescencia que as proxenitoras. O número de divisións celulares que poden ser seguidas está limitado polo nivel de autofluorescencia das células non marcadas, pero tamén pola uniformidade no tamaño da poboación celular marcada (Hodgkin *et al.*, 1996; Quah *et al.*, 2007).

Logo de ter purificados os PBMCs como se describiu en apartados anteriores, foron lavados e resuspendidos en RPMI. Unha vez contados, engadiuse 5  $\mu$ M de CFSE (a partir do stock 5 mM CFSE en DMSO) a cada  $1 \times 10^7$  células/ml. A marcaxe realizouse a obscuras, a temperatura ambiente durante 8 minutos, parando a reacción cun volume igual de soro bovino fetal. As células laváronse 4 veces en medio completo, e a continuación foron postas en cultivo nas condicións requeridas en cada experimento. Pasados 5 días de cultivo, as células foron recollidas e lavadas varias veces con PBS. A adquisición das mostras en tódolos experimentos de citometría de fluxo fíxose nun citómetro FACScalibur

(BD) do Laboratorio de Inmunoloxía do Complexo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS).

## 4. MICROSCOPIA CONFOCAL

A microscopía confocal permite o estudo de mostras con marcaxe fluorescente, facendo seccións ópticas das mesmas. A obtención de imaxes prodúcese mediante un varrido puntual confocal. As lentes do microscopio enfocan a luz do láser sobre un punto focal da mostra e a continuación o láser explora a mostra punto por punto. A luz emitida ou reflectida no punto focal regresa atravesando o obxectivo e enfócase sobre un segundo punto no que se sitúa unha pequena abertura (*pinhole*), que é a responsable de que unicamente a luz do punto focal chegue ata o detector. Deste xeito, a luz procedente dos planos superiores ou inferiores ó plano focal non atravesa o *pinhole* e non chega ó detector, e polo tanto non formará parte da imaxe resultante.

As condicións de cultivo para os experimentos de microscopía confocal foron similares as descritas para os experimentos de citometría de fluxo. As células foron cultivadas durante 5 días en placa a unha densidade inicial de  $0.5 \times 10^6$  células/ml en ausencia de estimulación ou ben en presenza de activadores como PHA 2.5 µg/ml+IL-12 2 ng/ml ou PHA 2.5 µg/ml+ADA 1.25 U/ml. Transcorrido este período, laváronse con PBS e contáronse para utilizar  $1 \times 10^6$  células/condición e 2 tubos para cada unha delas (duplicados). A fixación realizouse con PFA ó 1% (p/v) durante 10 minutos a RT, seguida dun lavado con PBS.

A diferenza dos experimentos de citometría, as marcaxes fluorescentes para microscopía confocal realizáronse en tubos eppendorf de 1.5 ml. Nos experimentos de colocalización entre CD26 ou o gangliósido GM1 con CD45RO a marcaxe fíxose en 2 pasos: nun primeiro paso tivo lugar a marcaxe primaria, con isotipo (controis negativos) ou anti-CD45RO (marcaxe específica; *mouse anti-human* anti-

CD45RO UCHL-1; Pharmingen, BD), a unha concentración de 10 µg/ml durante 30 min a 4°C na oscuridade. Nun segundo paso marcamos todos os tubos co anticorpo secundario; neste caso empregouse, para detectar a molécula de CD45 marcada co anticorpo primario, dúas aproximacións diferentes: a) *goat anti-mouse* (GAM; 1/200) FITC, nos experimentos de colocalización CD26/CD45RO; e b) Alexa Fluor 633 *goat anti-mouse* IgG<sub>2a</sub> (1 µg/ml; Molecular Probes, Invitrogen), nos de colocalización CD45RO/GM1. Nestes últimos, ademáis, tamén marcamos as células ca subunidade B da toxina colérica (*Cholera toxin subunit B*, Alexa Fluor 488 conjugate; Molecular Probes, Invitrogen), unha proteína que detecta o gangliósido GM1, característico de zona *raft* (30 min, 4°C, oscuridade). A continuación laváronse as células con PBS (1200 rpm, 4°C, 7 minutos). Nos experimentos de colocalización CD26/CD45RO foi necesaria unha última etapa de marcaxe, neste caso co anticorpo Ta1-TRITC (dilución 1/10). Tralos pertinentes lavados, retirouse o sobrenadante completamente e engadíronse 10 µl do medio de montaxe Immunofluore (ICN Medical). Finalmente, as células foron recollidas e depositadas nun portaobxectos. Colocouse o cubreobxectos e as mostras foron almacenadas a 4°C en oscuridade ata a súa visualización no microscopio confocal (Leica TCS-SP2) da Unidade de Microscopía Electrónica e Confocal da RIAIDT (Rede de Infraestructuras de Apoio á Investigación e ao Desenvolvemento Tecnolóxico) da USC.

## 5. SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA

Para solubilizar as membranas plasmáticas celulares traballouse con alícuotas de 200 millóns de blastos ou PBMCs sen estimular, que se suspenderon nun volume final de 340 µL de tampón de lise TKM (50 mM Tris pH 7,4; 25 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA), que contiña tamén 1% (v/v) Triton-X-100 (deterxente non iónico indicado para solubilizar *rafts*, Magee *et al.*, 2003). A este tampón engadíronselle os seguintes

inhibidores de proteasas: 5 µg/ml aprotinina; 10 µg/ml leupeptina; 1 mM PMSF (todos eles inhiben as serín proteasas, mentras que os dous últimos bloquean tamén as cisteín proteasas). A lise tivo lugar durante 30 minutos, en xeo e con axitación forte cada 5 minutos.

## 6. SEPARACIÓN DE DOMINIOS DE MEMBRANA PLASMÁTICA MEDIANTE GRADIENTES DE SACAROSA

A lise utilizando deterxentes non iónicos é insuficiente para disgregar por completo as membranas celulares, dado que nelas existe unha distribución heteroxénea de lípidos, que orixina estruturas con diferente composición e propiedades físicas e químicas. Este é o caso dos *rafts*, microdominios insolubles en deterxentes non iónicos (DRMs; *detergent resistant microdomains*) debido a súa estrutura fortemente empaquetada, a cal se relaciona coa composición enriquecida en fosfolípidos de cadea saturada, esfingolípidos con grupos acilos longos saturados, e colesterol. Este empaquetamento e resistencia ós deterxentes dos *rafts* permite a súa separación por medio de gradientes de densidade. O proceso de obtención dos DRMs mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa realízase tendo en conta a maior flotabilidade deles con respecto ó resto de compoñentes da membrana plasmática

Utilizouse con esta fin unha variación do método de centrifugación zonal descrito por Brown e Rose (Brown & Rose, 1992). No fondo dun tubo de ultracentrífuga (Ultra-clear 5 ml para rotor basculante 55 Ti, Beckman) depositouse unha mestura 1:1 (p/v) de sacarosa 80% (en tampón de lise sen deterxente) e lisado celular (obtido nas condicións descritas no apartado anterior), de xeito que a concentración final de sacarosa fose dun 40%. A continuación, creouse por enriba un gradiente discontinuo de sacarosa, depositando coidadosamente unha solución que contiña 36% (p/v) sacarosa en tampón de lise (TKM, con inhibidores

de proteasas, pero sen deterxente), e sobre ela outra de 5% (p/v) sacarosa (tamén en tampón de lise sen deterxente). Os volumes depositados no tubo foron 775, 2700 e 1600  $\mu$ L de 40%, 36% e 5% (p/v) sacarosa, respectivamente. Os gradientes foron centrifugados nunha ultracentrífuga Beckman L8-M, rotor 55Ti a 40000 rpm ( $200000 \times g$ ) durante 18 horas a 4°C. As fraccións insolubles de membrana (*rafts*) apareceron na interfase do 5 ó 36% no gradiente de sacarosa e foron visibles como unha nube blanquecina. O contido dos tubos foi recollido en 11 fraccións de 450  $\mu$ L, das que se valorou inmediatamente a actividade fosfatasa alcalina (asociada a *rafts*).

## **7. MEDIDA DA ACTIVIDADE FOSFATASA ALCALINA**

Para a valoración da actividade fosfatasa alcalina, 20  $\mu$ L de cada fracción recollida no apartado 6 foron adsorbidos mediante vacío a unha membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore) previamente activada 10 segundos en metanol, 1 minuto en auga destilada e 15 minutos en tampón TBS (20 mM Tris pH 7.6; 0.13 M NaCl). Para a adsorción da proteína a membrana empregouse un sistema de *dot-blot* (Minifold, Schleider & Shuell). Os pocillos laváronse con 200  $\mu$ L de TBS antes e despois de cargar a mostra. A membrana foi revelada nunha solución que contiña os substratos para a reacción enzimática da fosfatasa alcalina: BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) e NTB (azul de tetrazolio), preparada segundo as instrucións do fabricante (Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit, Bio-Rad).

## **8. WESTERN BLOT**

No caso dos *dot-blots*, as mostras (25  $\mu$ L de cada fracción) foron transferidas directamente por vacío (do mesmo xeito que se fixo para valorar a actividade fosfatasa alcalina) a unha membrana de PVDF. A continuación, a membrana bloqueouse durante 1 hora a RT con tampón de bloqueo (TBS pH 7.6 + 1% Tween-20 (v/v) + 10% (p/v) leite

desnatado en polvo). A detección das proteínas levouse a cabo mediante western blot utilizando os anticorpos monoclonais anti-CD71 (clon M-A712, dilución 1:2000, BD Pharmingen), anti-CD26 (clon TP1/16, dilución 1:200, purificado no noso laboratorio) e anti-CD45RO (clon UCHL-1, dilución 1:3000, BD Pharmingen). Como anticorpo secundario utilizouse un anti-IgG policlonal de rato conxugado con HRP (dilución 1:3000; GE Healthcare). Tras cada incubación, realizáronse 3 lavados con TBS-T (15-5-5 minutos) e revelouse a membrana (exposición de 1 minuto) utilizando ECL<sup>plus</sup> (GE Healthcare).

## 9. SILENCIAMENTO DO XEN DE CD26 MEDIANTE siRNAs

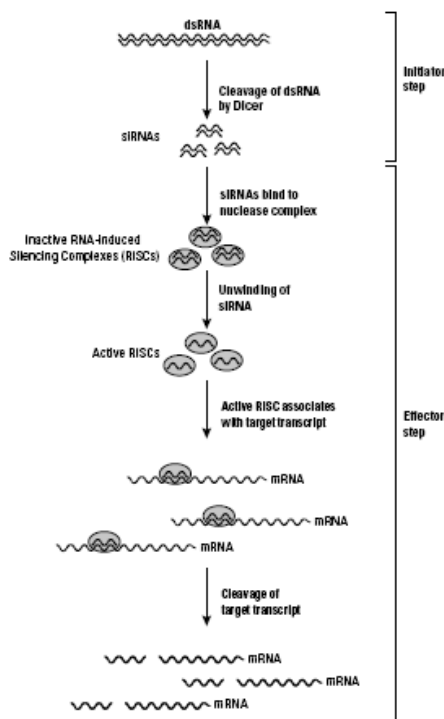
### 9.1 ANTECEDENTES

A interferencia de RNA é unha técnica que permite inhibir a expresión dun xen determinado utilizando un pequeno fragmento de RNA, dirixido fronte a unha secuencia concreta do mRNA producido polo xen que se quere silenciar. Os siRNAs (*short interference RNA*) son moléculas de dobre cadea, de arredor de 20-25 nucleótidos, complementarias e que se orixinan a partir dun RNA de dobre cadea (non a partir do mRNA) máis longo que é procesado pola RNAasa Dicer. Estes fragmentos de RNA de dobre cadea máis pequenos, os siRNA, presentan extremos 5' fosfato e dous nucleótidos libres nos extremos 3' hidroxilo (Berstein *et al.*, 2001).

O mecanismo de interferencia de ARN (Figura 11) iníciase cando unha célula recibe un RNA de dobre cadea largo (*double stranded RNA* ou dsRNA), que pode xerarse a partir dun transxén esóxeno, dun intruso viral ou dun elemento xenético propio. O RNA esóxeno é recoñecido pola célula e unido á enzima Dicer, que corta o RNA de dobre cadea en fragmentos de arredor de 22 nucleótidos. Estes pequenos RNAs de dobre cadea (siRNAs) incorpóranse ó complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Hammond *et al.*, 2001; Hannon, 2002), que ó ser



activado utiliza a cadea antisentido do siRNA como guía para localizar a cadea de mRNA diana complementaria a ela e posteriormente degradalo, o que provoca a supresión do xen (Rana, 2007). Esta supresión prodúcese a nivel post-transcripcional, e de xeito específico á secuencia, e pode producir unha redución significativa (*knock-down*) ou completa (*knock-out*) dos niveis da proteína diana.



**Figura 11. Mecanismo de interferencia de RNA.** Tomado de *Knockout RNAi Systems User Manual* (Clontech, PT3739-1).

En células somáticas de mamífero foi complicado establecer RNAi debido ó silenciamento xénico inespecífico. A transfección de dsRNAs de máis de 30 nucleótidos activa unha resposta antiviral, mediada tanto pola proteína quinasa R (PKR) ou pola RNasa L. A actividade de PKR leva a unha represión global da tradución, mentras que a RNasa L cataliza a degradación de RNAs inespecíficos (*off-targets*). Por ese motivo, en células de mamíferos hai que introducir siRNAs de menos de

30 nucleótidos que evite a devandita resposta antiviral e o silenciamento inespecífico. Os siRNA poden ser sintetizados *in vitro* e introducidos directamente nas células mediante transfección, unha aproximación efectiva pero cara. Outra opción é introducir na célula diana un plásmido de expresión. Este último contén unha secuencia que ó ser transcrita pola maquinaria celular, xenera un RNA de dobre cadea con forma de horquilla que contén o siRNA. Neste último caso fálase dos shRNA (*short hairpin RNA*), precursores dos siRNA e que teñen que ser procesados dentro da célula para xerar moléculas similares a siRNA funcionais.

## 9.2 SISTEMAS RETROVIRAIS

Sen embargo non tódolos tipos celulares son fáciles de transfectar usando vectores de expresión, como é o caso das células que crecen en suspensión (por exemplo, os linfocitos). Por ese motivo foron creados protocolos nos que se utiliza un paso intermedio: a secuencia que codifica o shRNA introdúcese en plásmidos retrovirais, cos que se transfecta unha liña celular empaquetadora. Esta liña empaqueta os RNAs recombinantes en partículas infecciosas retrovirais, xa que expresa varios dos xenes (*gag*, *pol*, *env*) necesarios para a formación das partículas virais e a replicación; por exemplo o xen *env* codifica a proteína da envolta do virus que determina o tipo de célula que os virións van infectar (tropismo). Pola súa parte, o plásmido retroviral proporciona, os elementos de transcrición e procesamento do transcrito xenómico viral que codifica o shRNA de interese, así como un marcador de selección (xen de resistencia a un antibiótico) e un sinal de empaquetamento  $\psi^+$ , recoñecido polas proteínas virais e que permite crear partículas infecciosas ó cabo de 48-72 horas. Os virus producidos poden infectar as células diana e transmitir así os xenes que portan.

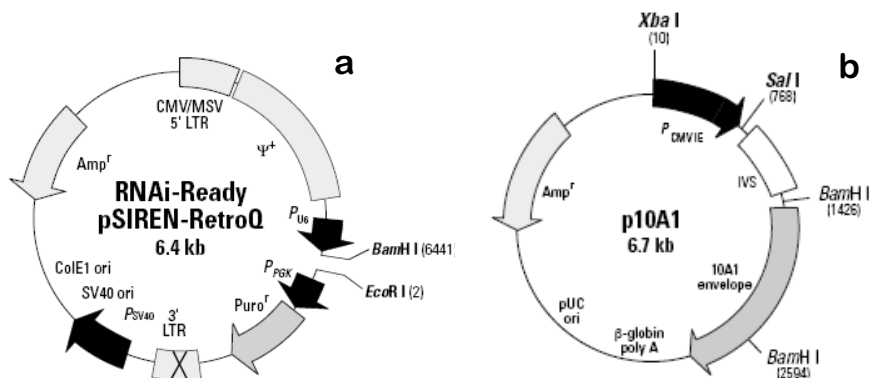
Baseándonos nos traballos de Yamochi *et al.* e Sato *et al.*, 2005, nos que se empregou a interferencia de RNA para inhibir a expresión de CD26, elixiuse a aproximación retroviral. Estes investigadores

seleccionaron como blanco a secuencia ATCATGCATGCAATCAAC, situada entre os nucleótidos 1768 e 1785 do cDNA de CD26. Esta secuencia denomínase *sense* ou específica. Como control negativo para comprobar os efectos inespecíficos do siRNA, utilizouse a mesma secuencia, pero mutada (*missense*): ATCTTGCAAGCAAACAAC. Tamén se sintetizaron as secuencias complementarias, de xeito que dous DNA de dobre cadea foron clonados nun vector retroviral RNAi-Ready pSIREN-RetroQ (Clontech) (Figura 12a). Este vector contén, entre outros: un extremo 5' LTR cun promotor CMV/MSV, un sinal de empaquetamento  $\psi^+$ , un sitio de clonación *Bam*HI-*Eco*RI, un sitio de terminación de transcrición, un xen de selección (puromicina) e un extremo 3' LTR. Utilizouse un segundo vector (p10A1) (Figura 12b), co xen *env* que codifica a proteína da envolta viral, para a cotransfección da liña empaquetadora. Os virus que presentan a proteína 10A1 poden entrar nas células a través de dúas moléculas de superficie: o receptor de retrovirus anfotrópico ou o receptor GALV, permitindo un maior rango de hóspedes que no caso de virus empaquetados con outras envoltas proteicas.

Transformouse a cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* co vector RNAi-Ready pSIREN-RetroQ (coa secuencia shRNA CD26 ou o shRNA *missense*), e unha vez purificados (*minipreps*) fixéronse ensaios de restricción para ver que realmente contiveran o inserto de interese; estes foron, ademais, secuenciados (datos non amosados). Logo de seren propagados os plásmidos RNAi-Ready pSIREN-RetroQ e p10A1 en bacterias DH5 $\alpha$  (*maxipreps*), realizouse a cotransfección transitoria (Clonfectina, Clontech) da liña empaquetadora GP2-293 con ambas clases de vectores para producir retrovirus infectivos. A liña empaquetadora proporcionoulles os retrovirus os xenes *gag* e *pol*, necesarios para a súa viabilidade. Deste xeito, aínda que os virus resultantes poden infectar células e transmitirllas a secuencia de interese, non se poden replicar

### 3. Material e métodos

porque as liñas celulares diana carecen da estrutura viral e dos xenes da polimerasa (*pol*) e a integrasa (*gag*) virais.



**Figura 12. Características dos vectores RNAi-Ready pSIREN-RetroQ e p10A1 (Clontech).**

Unha vez recollidos os sobrenadantes virais (48-72 h) foron centrifugados (3000 rpm, 10 min, 4° C) e filtrados (0.45 µm). Para inhibir o efecto potenciador de IL-12 sobre a expresión de CD26, activáronse as PBMCs con PHA (2.5 µg/ml) ± IL-12 (10 ng/ml) durante 72 h, e tratadas con 8 µg/ml de polibreno estéril antes da infección cos sobrenadantes virais mediante un protocolo de centrifugación que maximizaba o contacto entre os virións e as células diana. Unha vez infectadas, as células foron sementadas en placas de 24 pocillos durante 48 h. Sen embargo, non fomos capaces de detectar por este sistema (ou empregando sobrenadantes virais máis concentrados procedentes de clones estables de células empaquetadoras) unha inhibición da expresión de CD26 nos blastos coestimulados con IL-12, probablemente debido a algún problema da técnica, como un título insuficiente dos sobrenadantes virais.

### 9.3 ACCELL siRNA

Coa fin de simplificar o protocolo de RNAi e de gañar en efectividade, comezamos a traballar co sistema Accell siRNA (Dharmacon), no que se usa unha mistura de catro siRNA sintetizados *in vitro* dirixidos especificamente a distintas rexións mRNA de CD26 (Figura 13). Os siRNAs están deseñados pola compañía de xeito que se reduzan ó máximo posible os efectos *off-target*, e xa foran probadas con bos resultados en PBMCs humanas según o fabricante. Nestes experimentos tamén se empregaron dous tipos de siRNA para controlar os efectos inespecíficos: un *Accell non-targeting siRNA pool* (Número de catálogo D-001910-10-05) e un *Accell green non targeting siRNA* (Número de catálogo D-001950-01-05), un siRNA fluorescente que permite visualizar a incorporación destas moléculas á célula.

Este sistema presenta unha importante vantaxe fronte a outras técnicas de interferencia de RNA: non require o uso de axentes de transfección nin de vectores virais, xa que son capaces de atravesar a membrana e introducirse na célula por si mesmos. Os siRNA foron resuspendidos a unha concentración stock 100  $\mu$ M empregando un tampón comercial diluído 1X (5X *siRNA buffer*, B-002000-UB-100; levado a 1X con auga libre de RNAsas, B-003000-WB-100). As células (PBMCs; 50000/pocillo) foron resuspendidas nunha placa de 96 pocillos de fondo redondo en *Accell delivery media* (B-005000-500) en presenza ou ausencia de PHA $\pm$ IL-12. Os cultivos foron suplementados, ou non, cunha concentración 0,02  $\mu$ M dun dos dous Accell siRNAs, ben o *Accell non-targeting siRNA pool* ou o *Accell SMART pool* específico do mRNA de CD26. A placa foi incubada a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 5-6 días.

3. Material e métodos



Secuencia diana do shRNA CD26 nos experimentos de RNAi mediante sistemas retrovirais

Secuencias diana dos siRNA que forman parte do Accell SMART pool (E-004181-00-0005, Human DPP4, NM\_001935) nos experimentos de RNAi mediante o sistema Accell de Dharmacon (Thermo)

Figura 13. Rexións no cDNA de CD26 que se corresponden cas secuencias do mRNA recoñecidas polos siRNA nos experimentos de RNAi.

## 10. MEDIDA DE PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE BrdU

Para cuantificar o número de células que están na fase S do ciclo celular substituíse o método tradicional radioactivo que mide a incorporación de [ $^3\text{H}$ ] timidina no DNA polo de marcaxe cun análogo de timidina non radioactivo denominado bromodeoxiuridina (BrdU). Para estes experimentos as PBMCs foron cultivadas en placas de 96 pocillos de fondo redondo, a unha concentración celular de  $0,25 \times 10^6$  células/ml (50000 células por pocillo), catro pocillos por cada condición. O cultivo durou 4 días en ausencia de estímulo algún, ou ben engadindo ó medio completo  $2 \mu\text{g/ml}$  de PHA  $\pm 12.5 \mu\text{M}$  Diprotina A (DpA), un tripéptido con secuencia Ile-Pro-Ile que funciona como inhibidor competitivo da actividade DPPIV de CD26. Dous tipos de controis foron incorporados tamén as placas: por una parte os blancos, catro pocillos contendo só medio de cultivo (sen células); por outro lado os pocillos *background*, catro pocillos de células activadas á mesma densidade e cantidade de PHA cos anteriores, pero que non entrarían en contacto en ningún momento co BrdU.

Para a marcaxe das células foi empregado o *BrdU Cell Proliferation Assay*, da compañía Chemicon. Durante as derradeiras 18 h de cultivo ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) a solución de BrdU concentrada foi diluída 1:500 en medio de cultivo nunha campana estéril, e  $20 \mu\text{l}$  engadidos a cada pocillo da placa (coa excepción dos catro pocillos *background*). Rematada a incubación, a placa foi centrifugada a 1000 rpm 5 min, o sobrenadante descartado e as células fixadas durante 30 min a temperatura ambiente con  $200 \mu\text{l}$  de solución de fixación; para así fixar as células e desnaturalizar parcialmente a dobre cadea de DNA, de xeito que o anticorpo anti-BrdU poidera detectar a incorporación do análogo de timidina. Tras centrifugar, eliminar o sobrenadante e desfacerse do exceso de líquido poñendo a placa invertida sobre servilletas de papel (*blotting*), procedeuse a realizar tres lavados ( $300 \mu\text{l/pocillo}$ ) con solución

de lavado 1X. O exceso de tampón eliminouse volteando a placa sobre un papel secante. A continuación engadiuse a cada pocillo 100 µl dunha solución 200X do anticorpo anti-BrdU diluída a 1X cun tampón diluente proporcionado pola casa comercial. A incubación co anticorpo primario prolongouse durante 1 h a temperatura ambiente, e posteriormente foi seguida de tres lavados (300 µl/pocillo) con solución de lavado 1X e de retirada do exceso de líquido. O anticorpo secundario conxugado a peroxidasa (*goat anti-mouse IgG*), proporcionado 2000 veces concentrado, diluíuse a unha concentración 1X cun tampón específico e filtrado a través de un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro, para engadir 100 µl a cada pocillo durante 30 min a temperatura ambiente. Despois da incubación, lavouse a placa tres veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado, e unha con 300 µl/pocillo de auga destilada. Unha vez retirado o líquido sobranste, incubouse a placa co substrato de peroxidasa (TMB *peroxidase substrate*; 100 µl/pocillo; 30 min a temperatura ambiente) ea continuación parouse a reacción engadindo 100 µl/pocillo de *stop solution*, 30 min a temperatura ambiente). A placa foi finalmente lida a 450 nm nun espectrofotómetro lector de microplacas (Labsystems Multiscan MS).

## 11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foron realizadas co paquete estatístico R versión 2.9.2 do ano 2009. Utilizouse o contraste de Wilcoxon para medias pareadas adoptando un nivel de significación do 99% para aceptar/rexeitar a hipótese nula.



# Resultados e discusión





## 1. OPTIMIZACIÓN DO SISTEMA DE TRABAJO

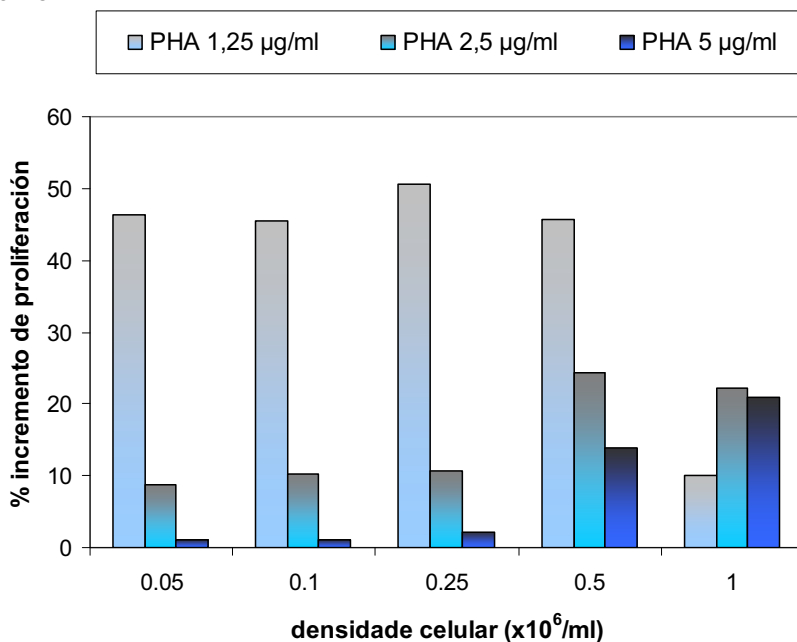
Para levar a cabo os obxectivos propostos neste traballo, nun primeiro momento puxéronse a punto as condicións que serían utilizadas nos cultivos celulares. O sistema celular que se utilizou foron linfocitos humanos obtidos a partir de concentrados leucocitarios procedentes de distintos doantes (proporcionados polo Centro de Transfusión de Galicia). A activación dos linfocitos iniciouse con fitohemaglutinina, un mitóxeno moi efectivo na diferenciación e proliferación dos linfocitos T procedente de *Phaseolus vulgaris* (PHA, Sigma). Esta activación previa era necesaria porque a IL-12 non provoca por si mesma activación, senón que reforza a activación das PBMCs xa inducida coa adición de lectinas mitoxénicas, aloantíxenos, anticorpos CD3-específicos ou diésteres de forbol (Trinchieri, 2003).

Este feito relacionase ademais coa inducción da expresión a nivel transcricional de IL-12R $\beta$ 1, e especialmente IL-12R $\beta$ 2, que a lectina provoca nos linfocitos T humanos. Dacordo cos nosos experimentos, os niveis de IL-12R $\beta$ 2, responsable dos sinais proliferativos de IL-12 (Rogge *et al.*, 1997; Szabo *et al.*, 1997), son máximos no día 3, con concentracións entre 10 e 20  $\mu$ g/ml de PHA, aínda que este feito está suxeito á gran variabilidade que se atopa entre os distintos doantes (Canda-Sánchez *et al.*, 2009b). Debido a que altas concentracións do mitóxeno inducen dano celular, normalmente traballouse en experimentos posteriores con concentracións subóptimas de PHA (de 1 a 5  $\mu$ g/ml), que permiten un equilibrio entre a expresión do receptor da IL-12 e a viabilidade celular.

Para estudar os sinais proliferativos orixinados pola IL-12 necesitábase ter as células nunhas condicións de activación axeitadas, tanto no referente á concentración celular como á concentración de lectina. Sábese que a inhibición por contacto entre células é un mecanismo de regulación da proliferación, daí a importancia da

#### 4. Resultados e discusión

densidade celular nos cultivos (Nelson & Daniel, 2002). Con todo isto en mente, cultiváronse PBMCs durante 5 días en presenza de diferentes concentracións de PHA, densidades celulares crecentes e en presenza ou ausencia de IL-12. Como estratexia para poder cuantificar a proliferación celular utilizouse *carboxyfluorescein acetate succinimidyl ester* (CFSE), un tinte fluorescente intracelular que nos permite monitorizar as distintas xeneracións dos linfocitos *in vitro*, xa que este composto ten a propiedade de dividirse de forma equitativa entre as células fillas logo da división celular. Por tanto, cada descendente ten a metade de fluorescencia que a correspondente célula nai, o que permite a detección de ata oito rondas de división (Hodgkin *et al.*, 1996; Quah *et al.*, 2007). Transcurridos os 5 días de cultivo, obtivéronse mediante citometría de fluxo as porcentaxes de células que se dividiron alomenos unha vez.



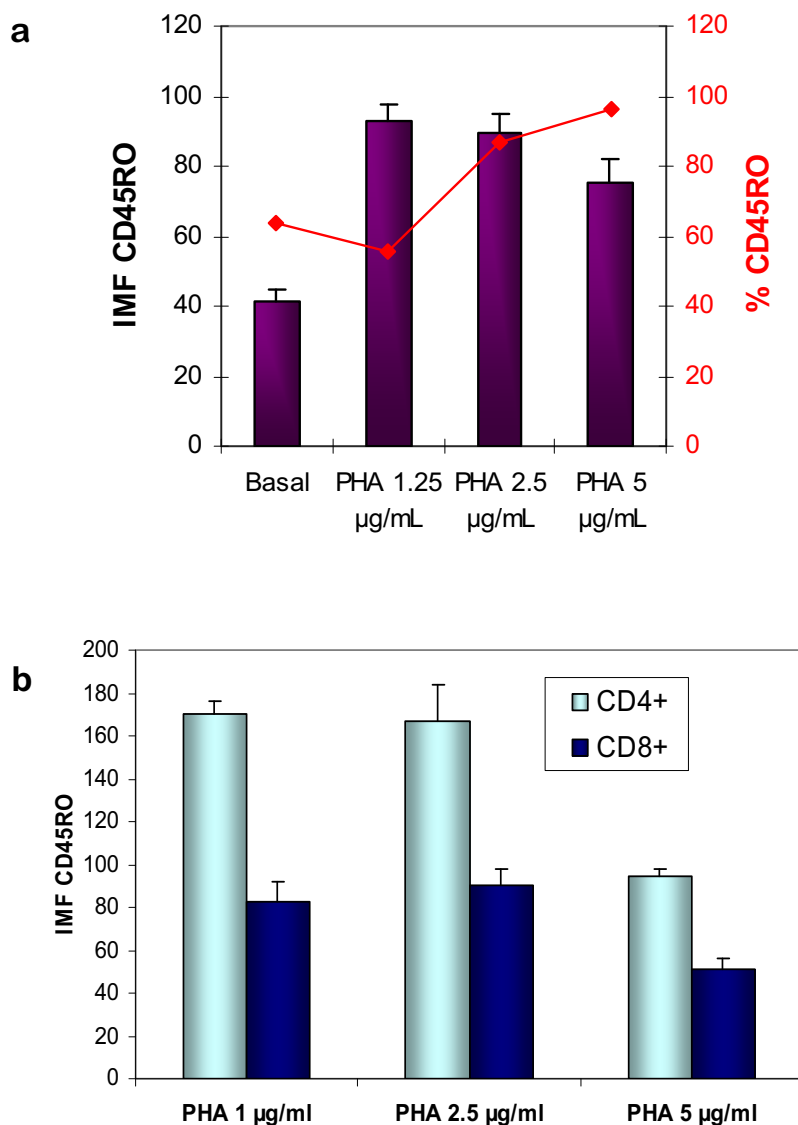
**Figura 14. Efecto da densidade celular e da concentración de mitóxeno sobre a proliferación celular.** PBMCs cultivadas durante 5 días e activadas con 1.25, 2.5 ou 5 µg/ml PHA en presenza ou ausencia de IL-12 (2ng/ml). Marcaxe con CFSE. No eixo de abscisas aparece a porcentaxe de incremento de proliferación das células tratadas con PHA+IL-12 con respecto ás tratadas unicamente con PHA. Experimento representativo de n=4.

Á vista dos resultados obtidos e presentados na Figura 14 pódense concluír dúas cousas: i) que tanto unha gran concentración celular como unha concentración alta de mitóxeno causan unha elevada mortalidade celular, ii) que concentracións de mitóxeno e densidades celulares altas enmascaran o efecto proliferativo provocado pola coestimulación da IL-12. Debido a esto, escollimos de partida para os futuros experimentos as seguintes condicións: 1.25 µg/ml PHA e  $0.5 \times 10^6$  células/ml, modificadas en casos puntuais polos requerimentos do experimento.

Unha vez establecidas as condicións idóneas para a coestimulación por IL-12 pasamos a estudar como repercute esta coestimulación na expresión de dúas glicoproteínas que xogan un papel importante na modulación da sinalización vía TCR: CD26 e CD45RO.

## 2. INTERACCIÓN ENTRE CD26 E CD45RO. EFECTO DE CITOQUINAS

No contexto da activación da célula T, CD26 está proposto como un coestimulador da activación vía TCR (Dang *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1993). Por outra banda, CD45, en particular a isoforma RO, é esencial dado que defosforila o sitio inhibidor das quinasas Src (Irie-Sasaki *et al.*, 2001). No ano 1991 o grupo de C. Morimoto (Torimoto *et al.*, 1991; Ishii *et al.*, 2001) revelou que CD26 tiña como ligando a CD45, especialmente a isoforma RO. Un pouco máis tarde, o noso grupo profundizou no tema ó publicar que a citoquina IL-12 potenciaba dita asociación CD26-CD45RO, o que afectaba ó posicionamento de CD45RO na membrana. Xurdía así un novo mecanismo potencial de control da actividade tirosin-fosfatasa de CD45 (Lojo *et al.*, 2003; Salgado *et al.*, 2003). A importancia da relación entre ambas moléculas e da súa regulación (da expresión, da interacción e da localización) por parte da IL-12, levounos a deseñar os seguintes experimentos a fin de coñecer o seu papel na sinalización vía TCR.



**Figura 15. Efecto de PHA sobre a expresión de CD45RO.** PBMCs cultivadas durante 5 días, densidade celular  $0.5 \times 10^6$  células/ml, sen activar (basal), ou activadas con 1.25, 2.5 ou 5 µg/ml de PHA. Marcaxe con anti-CD45RO-PE UCHL-1. Experimento representativo de  $n = 4$ , represéntase media  $\pm$ SD. **a)** expresión de CD45RO global. A liña continua (♦) refírese á IMF de CD45RO, mentras que as barras indican a porcentaxe de células CD45RO<sup>+</sup>; **b)** expresión de CD45RO nas subpoboacións CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>

Nuns primeiros experimentos, estudiamos cultivos de PBMCs expostos a distintas concentracións de PHA, analizando a expresión de CD45RO en resposta á activación policlonal producida polo mitóxeno (é capaz de activar máis dunha vía de transducción de sinais, interaccionando con varias moléculas implicadas nelas, desencadeando unha resposta similar á activación vía TCR/CD3). Como se observa na Figura 15a, unha maior dose de PHA provoca un aumento na porcentaxe de células que expresan CD45RO (CD45RO<sup>+</sup>) así como un incremento na intensidade media de fluorescencia de CD45RO (IMF, directamente proporcional o número de moléculas CD45RO na superficie celular).

Sen embargo, as altas concentracións de mitóxeno enmascararían o efecto coestimulador de calqueira factor de crecemento, citoquina, etc. que fose empregado, como por exemplo IL-12 ou IL-2, polo que a concentración adecuada de PHA para os experimentos seguintes de avaliación dos niveis de CD45RO situouse no entorno dos 1.25-2.5 µg/ml, unha cantidade que coincidía deste xeito coa seleccionada para os experimentos de proliferación celular (1.25 µg/ml). Nesta serie de experimentos viuse tamén (datos non amosados) que o incremento na concentración de PHA facía aumentar a porcentaxe de células CD8<sup>+</sup> con respecto ás CD4<sup>+</sup> ó remate dos cultivos, o cal podería estar relacionado, como se discutirá máis adiante, coa observación (Figura 15b) dunha maior expresión de CD45RO (tanto en IMF como en porcentaxe) na subpoboación CD4<sup>+</sup> en comparación ca CD8<sup>+</sup>. Esta maior estimulación con PHA da poboación T citotóxica fai incrementar a devandita poboación CD8<sup>+</sup> en detrimento das CD4<sup>+</sup>, o que unido á súa menor expresión de CD45RO, pode ser a responsable do descenso da IMF global de CD45RO observada con altas concentracións da lectina (Figura 15a).

Sobre estas condicións iniciais, os cultivos foron tratados ou non con IL-12 para posteriormente analizar por citometría de fluxo o efecto sobre a expresión de CD45RO. De xeito idéntico ó acontecido coas altas

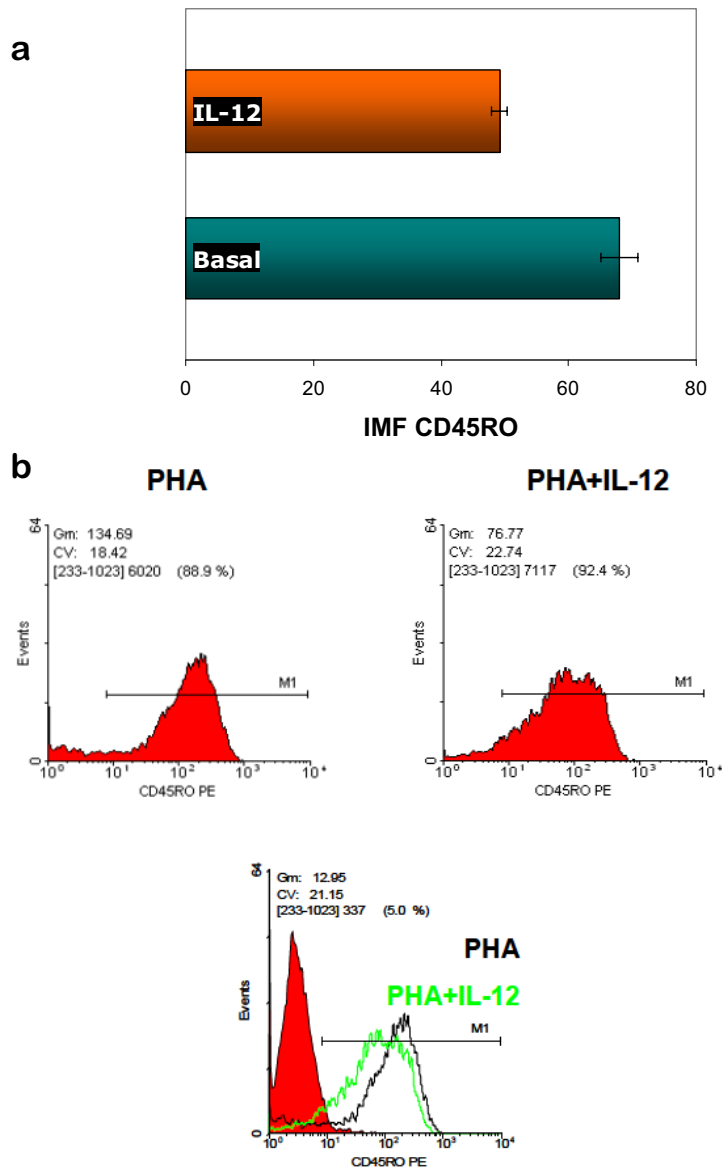
#### ***4. Resultados e discusión***

---

concentracións da lectina, a expresión de CD45RO medida en IMF (Figura 16) vese sensiblemente reducida en presenza de IL-12 comparado co control basal (células só activadas con doses subóptimas de PHA), pero non reduce a porcentaxe de células CD45RO<sup>+</sup>, que se mantén cercana ó 100% (datos non amosados).

Este resultado obtido mediante citometría de fluxo correspóndese con outros resultados anteriores do grupo nos que se observaba tamén unha diminución da expresión de CD45RO ó mesmo tempo que un aumento da actividade fosfatasa de Tyr, o que parecía descartar *a priori* a opción dunha redución real do número de moléculas CD45RO na superficie celular por parte de IL-12 mediante procesos de internalización (Salgado *et al.*, 2003). Algunhas das hipóteses que se barallaron entón como explicación á diminución da expresión de CD45RO causada por IL-12 (ou altas doses de PHA, como sinala o presente traballo) foron: 1) a perda de sialización, 2) o intercambio de isoformas de baixo peso molecular de CD45 polas de alto peso ou 3) a competición entre o anticorpo anti-CD45RO UCHL-1 e a molécula de CD26 polo mesmo epitopo na superficie de CD45RO, o que creaba un impedimento estérico.





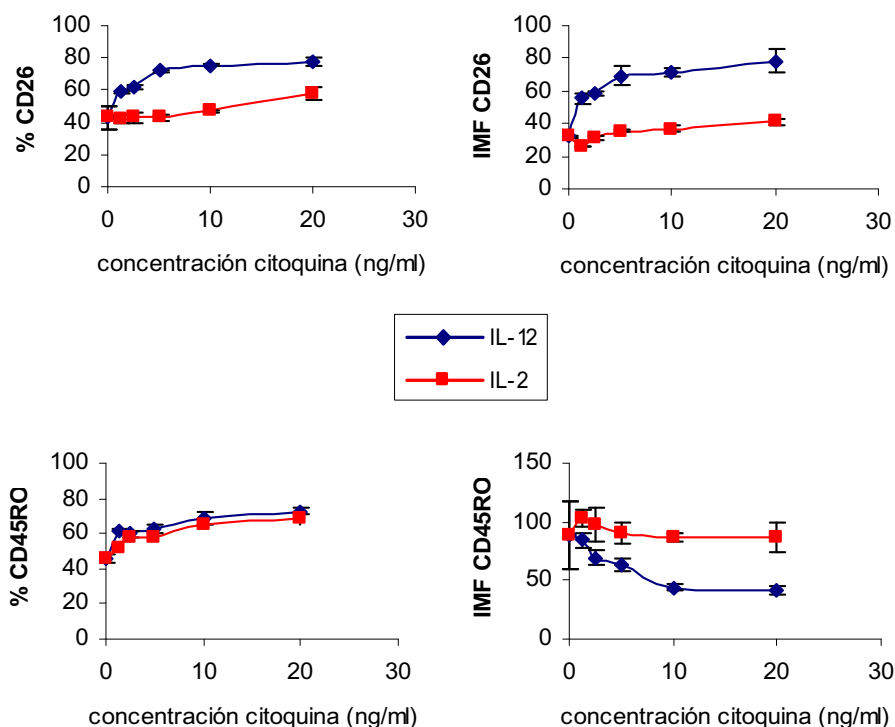
**Figura 16. Efecto de IL-12 sobre a expresión de CD45RO.**  
**a)** PBMCs cultivadas durante 5 días cunha densidade celular inicial de  $0.5 \times 10^6$  células/ml e activadas con 2.5 µg/ml de PHA, en presenza (“IL-12”) ou non (“Basal”) de IL-12 (2 ng/ml). Pasados os 5 días, as células foron marcadas con anti-CD45RO-PE. Represéntanse os valores medios de 9 experimentos. As medias son diferentes para un nivel de significación dun 99% cun p-valor de 0.003906 no contraste de Wilcoxon para mostras pareadas. **b)** Análise por citometría de fluxo do efecto da IL-12 sobre os niveis de CD45RO expresado en Gm= media xeométrica da IMF. Entre parénteses aparece a porcentaxe de eventos positivos para a marcaxe anti CD45RO-PE (UCHL-1).

Unha vez visto o efecto da IL-12 sobre a expresión de CD45RO considerouse oportuno estudar, neste mesmo modelo, o efecto que outras citoquinas relacionadas ou antagónicas da IL-12 tiñan sobre os niveis de CD45RO na superficie dos linfocitos T activados. Elixíronse por unha banda, a IL-2, unha citoquina que sinerxiza coa IL-12 en células T e que complementa os sinais producidos polo complexo TCR-CD3 e mailo receptor de CD28, causando o desenvolvemento dunha resposta inmunitaria de tipo Th1 e a produción de IFN- $\gamma$  (Bacon *et al.*, 1996). Por outra banda, a IL-4, a principal citoquina responsable da diferenciación Th2 e o TNF- $\alpha$ , un regulador negativo da produción de IL-12 (Kriegel *et al.*, 2006). Nestes experimentos mediuse tamén en paralelo a expresión de CD26, molécula asociada a CD45RO (como xa se dixo) e cúa expresión aumenta en presenza de IL-12 e de IL-2 (Cordero *et al.*, 1997, Salgado *et al.*, 2000).

Os resultados (Figura 17) amosan como a presenza de IL-2 esóxena no medio de cultivo provoca un efecto moi similar ó causado pola IL-12, tanto sobre a expresión de CD45RO como sobre CD26, aínda que de menor intensidade, reducindo a cantidade de moléculas (IMF) de CD45RO na membrana plasmática ó mesmo tempo que aumentaba a porcentaxe de células CD45RO<sup>+</sup> e a expresión de CD26 (tanto a IMF como a porcentaxe de células CD26<sup>+</sup>).

O efecto destas citoquinas modulando a expresión de CD26 e CD45RO na membrana plasmática de blastos humanos podería estar relacionada coa función de CD45 de defosforilar e activar as quinasas da familia Src responsables das fosforilacións iniciais posteriores ó acoplamento antixeno/MHC-TCR. Este control da actividade tirosín fosfatasa de CD45 pode levarse a cabo mediante diferentes mecanismos, como por exemplo a dimerización (Xu & Weiss, 2002) ou a relocalización na membrana plasmática de CD45RO mediada por CD26 e influenciada por citoquinas, unha posibilidade sobre o que noso grupo de investigación ten teorizado con anterioridade (Salgado *et al.*, 2000,

2003). Precisamente, ditas quinasas Src concéntranse nos microdominios *raft* da membrana plasmática (revisado recentemente en Bijlmakers, 2009) polo que o alonxamento ou acercamento de CD45RO de ditas rexións podería afectar a sinalización vía TCR.



**Figura 17. Efecto das interleuquinas IL-12 e IL-2 sobre a expresión de CD45RO e CD26.** As PBMCs foron estimuladas con 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de PHA en presenza de concentracións crecentes de citoquinas (0-20 ng/ml) e cultivadas durante 5 días a unha densidade de  $0.5 \times 10^6$  células/ml. A marcaxe foi realizada con anti-CD26 TP1/16-FITC e anti-CD45RO-PE (UCHL-1). Datos dun experimento representativo dos oito realizados ( $n=8$ ). Cada punto corresponde á media  $\pm$  SD de triplicados. **a)** porcentaxe de moléculas CD26<sup>+</sup>. **b)** IMF CD26. **c)** porcentaxe de moléculas CD45RO<sup>+</sup>. **d)** IMF CD45RO.

Plantexamos entón estudar a localización destas dúas proteínas (CD26 e CD45RO) na membrana plasmática da célula T mediante a microscopía confocal. Esta técnica é amplamente empregada polos investigadores para visualizar a localización, distribución e mobilidade de

#### ***4. Resultados e discusión***

---

moléculas individuais nas membranas. Tamén facilita a obtención de imaxes nítidas e de gran resolución, así como “seccións ópticas” da mostra, permitindo avaliar o nivel de cercanía física entre as dúas proteínas cun grao de resolución de 250-300 nm. Para realizar estes experimentos, as células foron tratadas en idénticas condicións ás descritas na Figura 17 de xeito que puideran relacionarse as análises de expresión de CD45RO e CD26 por citometría cas de colocalización. Nas análises de microscopía de fluorescencia presentadas neste traballo estudiáronse gran cantidade de campos en cada mostra, escollendo o máis representativo da situación xeral estudiada.

Os resultados obtidos nesta nova serie de experimentos quedan reflectidos na Figura 18, onde podemos ver en primeiro lugar que en células estimuladas só con PHA (Figura 18a) a expresión das proteínas CD26 e CD45RO era alta. Ademais, ambas moléculas presentaban un grao de colocalización moi elevado. Podemos dicir que alí onde hai presenza de CD26 e CD45RO na superficie celular, ambas moléculas están o suficientemente próximas (menos de 250-300 nm) como para detectarse colocalización.

Se agora consideramos a Figura 18b, onde se recollen os resultados obtidos para as células activadas con PHA e coestimuladas IL-12, podemos ver que as células amosan unha elevada expresión de CD26 pero, pola contra, unha moi baixa de CD45RO dacordo coa reducida fluorescencia asociada ó anticorpo anti-CD45RO. Nesta situación, e a pesar de que os ensaios de coimunoprecipitación detectan maiores niveis de asociación entre CD26 e CD45RO en células coestimuladas con IL-12 (Salgado *et al.*, 2003) a colocalización entre ámbalas dúas foi tamén moi baixa.

Cando os linfoblastos foron coestimulados con IL-2 (Figura 18c) os resultados de fluorescencia concordaban cos obtidos mediante citometría de fluxo (Figuras 17b e d) no que se refire ó aumento da expresión de

CD26 e de CD45RO xerado por IL-2. Como se aprecia na figura a expresión de ambas moléculas é alta, xa que a coestimulación con esta citocina, a diferenza de IL-12, non provoca diminución do número de moléculas de CD45RO detectadas na superficie dos linfocitos. Debido a este feito, a colocalización entre ambas moléculas é elevada.

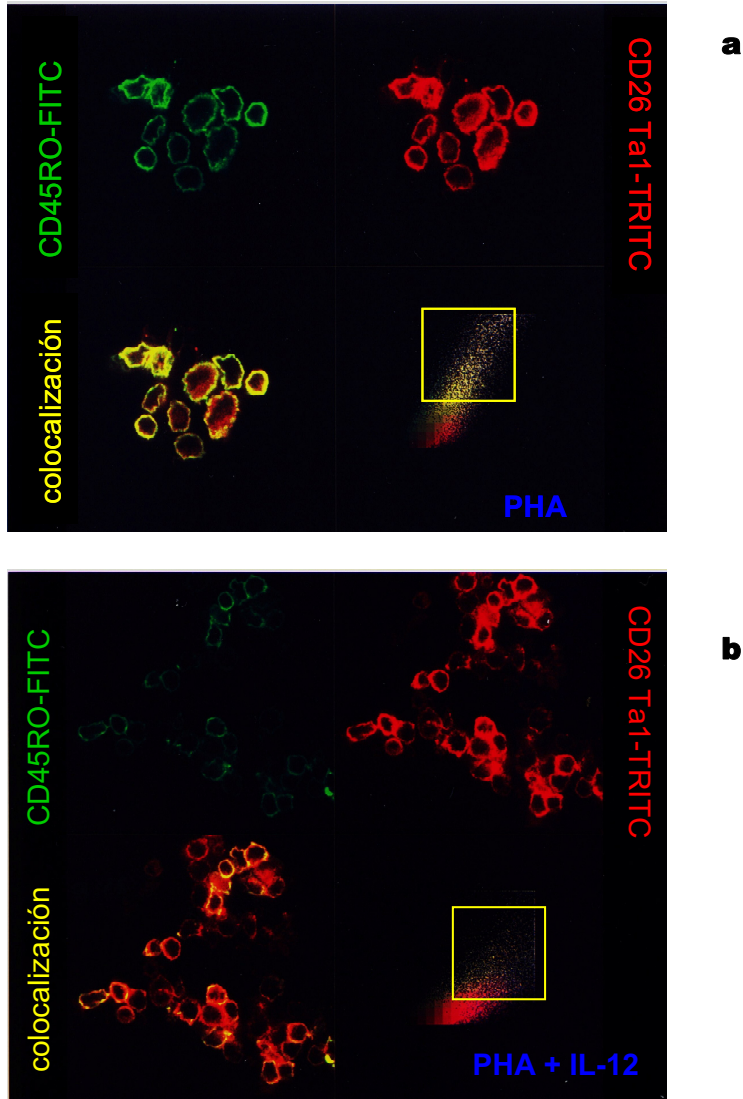
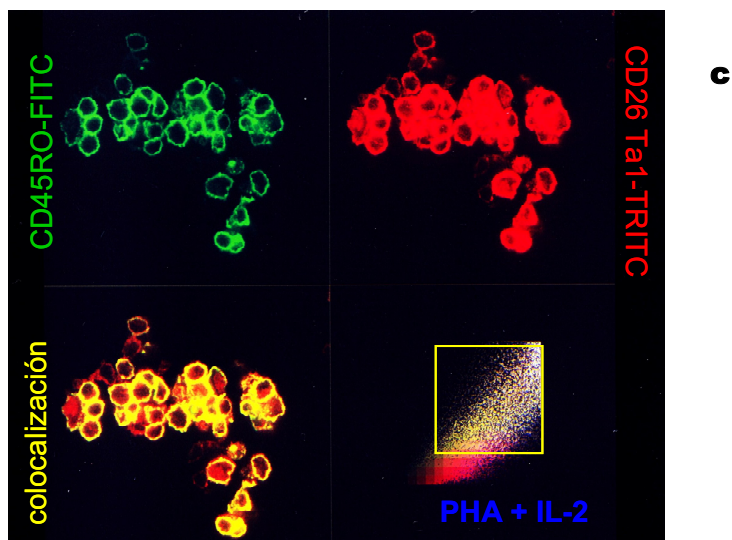


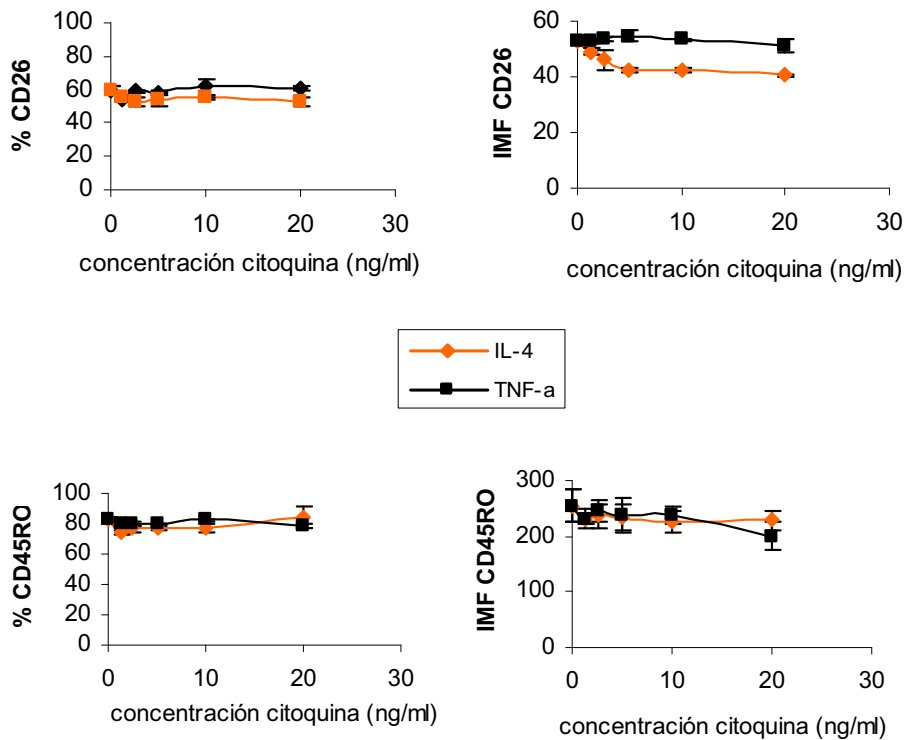
Figura 18 (ver pé en páxina seguinte)



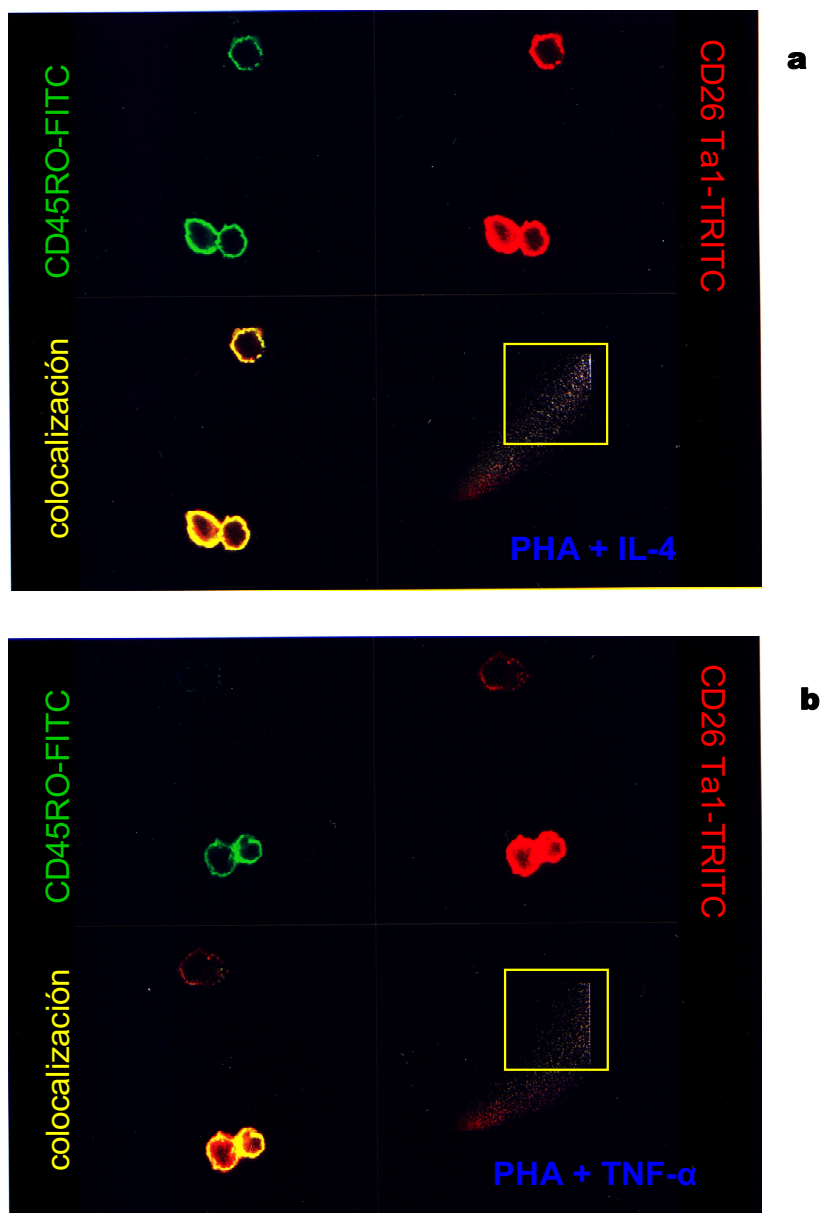
**Figura 18. Efecto das interleuquinas IL-12 e IL-2 sobre a expresión de CD45RO e CD26. Análise por microscopía confocal.** As células foron cultivadas nas condicións da Figura 17. A marcaxe realizouse con anti CD45RO-FITC (verde) e anti CD26 Ta1-TRITC (vermello). En amarelo aparecen os puntos onde colocalizan ambas moléculas. Nos blastos tratados con IL-12 redúcese de xeito notable a expresión de CD45RO. **a)** PHA (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) **b)** PHA (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )+IL-12 (2ng/ml) **c)** PHA (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )+IL-2 (2ng/ml).

A continuación pasamos a estudar a outra parella de citocinas, a IL-4 e o TNF- $\alpha$ , repetindo exactamente os mesmos experimentos e condicións que os utilizados para o estudo con IL-12 e IL-2. A incubación dos linfoblastos durante 5 días con diferentes concentracións de IL-4 e TNF- $\alpha$  non tivo, o parecer, ningún efecto significativo sobre a expresión de CD45RO nin de CD26, a xuzgar polos resultados dos experimentos de citometría (Figura 19). Cando estas mesmas células foron analizadas por microscopía confocal (Figura 20) tampouco atopamos efectos significativos nin sobre a expresión de CD26-CD45RO nin sobre a colocalización de ambas moléculas. En todo caso, e despois de analizar moitas imaxes, podería decirse que a colocalización provocada polo

coestimulación con TNF- $\alpha$  era sempre maior que a que presentaban as células cultivadas en presenza de IL-4.



**Figura 19. Efecto comparativo de IL-4 e TNF- $\alpha$  sobre a expresión de CD45RO e CD26.** As PBMCs foron estimuladas con 2.5  $\mu$ g/ml de PHA en presenza de concentracións crecentes de citoquinas (0-20 ng/ml) e cultivadas durante 5 días a unha densidade de  $0.5 \times 10^6$  células/ml. A marcaxe foi realizada con anti-CD26 TP1/16-FITC e anti-CD45RO-PE UCHL-1. Datos representativos de  $n=8$ . **a)** porcentaxe de moléculas CD26 $^+$  **b)** IMF CD26 **c)** porcentaxe de moléculas CD45RO $^+$  **d)** IMF CD45RO.



**Figura 20. Efecto de IL-4 e TNF- $\alpha$  sobre a expresión de CD45RO e CD26. Análise por microscopía confocal.** As células foron cultivadas en condicións similares ás da Figura 19. A marcaxe realizouse con anti CD45RO-FITC (verde) e anti CD26 Ta1-TRITC (vermello). En amarelo amarecen as zonas de colocalización. O tratamento con IL-4 e TNF- $\alpha$  non provoca diminución da expresión de CD45RO comparado co control basal (PHA). **a)** PHA (2.5 $\mu$ g/ml)+IL-4 (2ng/ml). **b)** PHA (2.5 $\mu$ g/ml)+TNF- $\alpha$  (4ng/ml).



### 3. LOCALIZACIÓN DE CD45RO NA MEMBRANA PLASMÁTICA

As relacións entre moléculas de membrana nunca acontecen dun xeito aleatorio, senón como resultado das interaccións que as células manteñen con outras células do entorno (como no caso das sinapses inmunolóxicas) e tamén co medio que as rodea (como no caso das interaccións dos receptores de citoquinas cos seus ligandos). É a forma que ten a célula para recibir información do exterior e contestar dun xeito correcto. A membrana plasmática recibe estímulos e transfórmaos en sinais recoñecibles no interior celular que orixinan as respostas específicas. Nos anos 70 como resultado de diferentes aproximacións biofísicas postulouse a presenza de microdominios nas membranas celulares. Hoxe coñecemos que a organización tridimensional da membrana plasmática inclúe interaccións específicas entre lípidos e proteínas producindo compartimentos físicos funcionais nos microdominios lipídicos dinámicos denominados *rafts* (Brown & Rose, 1992; Simons & Ikonen, 1997). Os *rafts* están enriquecidos en colesterol, fosfolípidos saturados e glucoesfingolípidos creando un ambiente concreto que atrae a certas proteínas mentras que outras quedan excluídas. Este modelo de *raft* cobrou gran importancia sobre todo despois do descubrimento do seu importante papel na funcionalidade do linfocito T.

CD45 é unha glicoproteína moi abundante na membrana, pero a súa localización na célula é controvertida, con datos que demostran a súa asociación (Parolini *et al.*, 1996; Edmonds & Ostergaard, 2002) ou non (Xavier *et al.*, 1998; Janes *et al.*, 1999) ós microdominios lipídicos de membrana ou *rafts*. A localización celular de CD45 e maila súa accesibilidade ós substratos parecen ser moi relevantes no control da actividade desta fosfatasa na sinalización vía TCR. Neste sentido, o noso grupo publicou con anterioridade (Salgado *et al.*, 2003) a existencia dun cambio notable no nivel de asociación entre CD26 e CD45RO, e sobre

todo da distribución na membrana plasmática de CD45RO, cando as PBMCs humanas son coestimuladas con IL-12.

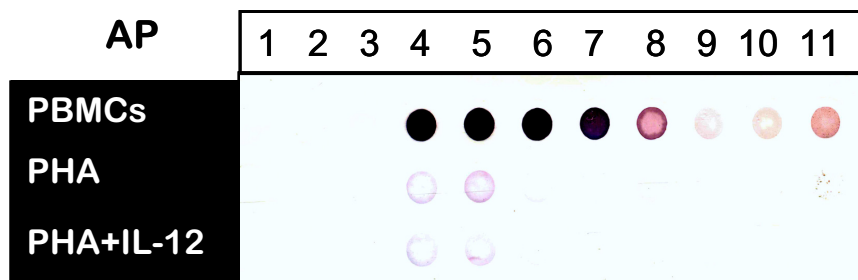
Dados os efectos de IL-12 (ou as altas doses de mitóxeno), pero non IL-2, IL-4 ou  $\text{TNF}\alpha$ , sobre os niveis de CD45RO, e coa fin de profundizar un pouco na influencia que IL-12 ten na localización desta fosfatasa na membrana, analizamos primeiramente, unha vez establecidas ás condicións óptimas de traballo, a cantidade de CD45RO nas diferentes fraccións resultantes de gradientes de sacarosa.

Hai que ter en conta que o feito de que unha proteína apareza en en fraccións de baixa densidade dos devanditos gradientes non é razón suficiente para ubicala categoricamente nos *rafts* lipídicos, xa que a extracción dos fosfolípidos de membrana con deterxentes non iónicos como T-X-100 podería promover a formación artefactual de distintos dominios lipídicos; e viceversa, se unha proteína non aparece ou aparece en pequena cantidade en fraccións de baixa densidade do gradiente non significa necesariamente que dita proteína non se atope neles na célula intacta (caso do TCR) (Magee & Parmryd, 2003). Por iso é imprescindible a utilización de marcadores específicos de zona *raft*, como a fosfatasa alcalina, e de zona non *raft*, como CD71, que sirvan como control á hora de avaliar a calidade do fraccionamento.

Algúns destes marcadores son proteínas con anclaxe GPI, moi específicas na súa localización ó estar unidas á membrana a través do seu extremo C-terminal por medio dunha forma glicosilada do fosfatidil inositol. Un exemplo deste tipo de proteínas é a fosfatasa alcalina (AP), cuia actividade enzimática pódese detectar colorimetricamente.

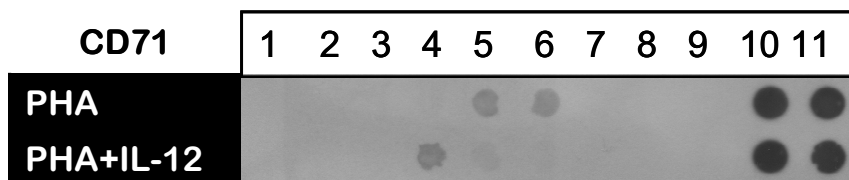
Como se observa no dot-blot da Figura 21, a actividade fosfatasa atópase principalmente concentrada nas fraccións de menor densidade (4-7), sendo practicamente inexistente nas fracción 10 e 11 (que se corresponden coas proteínas solubles en deterxentes) que presentan maior densidade. Hai que ter en conta que a expresión da AP está

fortemente regulada en linfocitos, porque o PHA provoca un acusado descenso na actividade do enzima que é todavía maior en presencia de IL-12. Este feito pode deberse a unha inhibición da actividade fosfatasa alcalina ou que a expresión da proteína está regulada durante a activación ou diferenciación dos linfocitos.



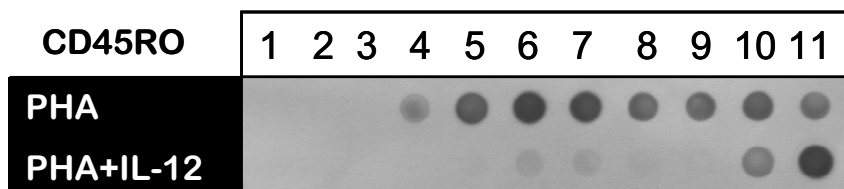
**Figura 21. Actividade fosfatasa alcalina nas diferentes fraccións resultantes dos gradientes de densidade.** As fraccións foron recollidas empezando pola parte superior do gradiente de menor a maior concentración de sacarosa. Mostras (20  $\mu$ l) das diferentes fraccións foron depositadas na membrana e a actividade enzimática foi revelada empregando un kit comercial. **PBMCs**=cultivo de linfocitos en medio completo, **PHA**=células cultivadas en presenza de 2.5  $\mu$ g/ml PHA e **PHA+IL-12**= células cultivadas con 2.5  $\mu$ g/ml PHA+2ng/ml IL-12.

Unha vez comprobada que a fosfatasa alcalina se concentraba na fracción de membrana de menor densidade (enriquecida en esfingolípidos/colesterol e, polo tanto, resistente a solubilización con deterxentes non iónicos), estudáronse outros marcadores de membrana como controis de pureza das fraccións de maior densidade (proteínas solubilizadas polo deterxente) cúa presenza foi descrita fóra dos *rafts* lipídicos. Para este fin utilizouse CD71, o receptor da transferrina, unha proteína de membrana que se utiliza como marcador neste tipo de estudos. Como amosa a Figura 22, CD71 localizouse en tódolos experimentos, e case exclusivamente, nas fraccións 10 e 11 dos gradientes.



**Figura 22. Detección de CD71 nas fraccións de alta densidade dos gradientes de sacarosa.** As fraccións foron ordeadas de menor (1) a maior densidade (11) e unha pequena alícuota de cada unha delas (20  $\mu$ l) depositada na membrana. A presenza de CD71, un indicador de fracción soluble, foi revelada mediante inmunoblot empregando un anticorpo monoclonal anti-CD71 como se describiu en material e métodos. **PHA**, PBMCs cultivadas 5 días en presenza de 2.5  $\mu$ g/ml PHA; **PHA+IL-12**, PBMCs activadas con 2.5  $\mu$ g/ml PHA suplementados con 2 ng/ml IL-12. Amósase un experimento representativo.

Coñecendo o control exercido por IL-12 sobre a expresión de CD45RO plantexámonos estudar se este feito afectaba á súa distribución na membrana plasmática dos linfocitos. Como xa se comentou, CD45 é unha proteína moi abundante na membrana, que está asociada maioritariamente a fracción soluble (*non-raft*) e que a presenza de IL-12 nos cultivos non afecta significativamente á distribución conxunta das isoformas de CD45 nos compartimentos de membrana (datos non amosados). Sen embargo, cando se estudiou a distribución na membrana da isoforma CD45RO, o efecto da IL-12 era facilmente apreciable (Figura 23): as células coestimuladas con IL-12 presentaban un cambio de distribución de CD45RO desde fraccións de baixa densidade (1-4) a fraccións de alta densidade (10-11), indicando un movemento na posición da molécula desde microdominios *rafts* a rexións *non-rafts*.

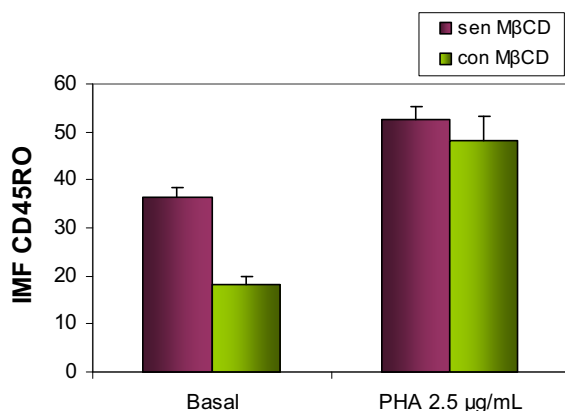


**Figura 23. Inmunoblots das distintas fraccións dos gradientes de densidade de sacarosa revelados con anti-CD45RO.** Expresión de CD45RO nas distintas fraccións do gradiente de densidade. As fraccións foron ordenadas de menor (1) a maior densidade (11) de flotación. **PHA**, células cultivadas 5 días en presenza de 2.5 µg/ml PHA; **PHA+IL-12**, células cultivadas con 2.5 µg/ml PHA+ 2 ng/ml IL-12. Preséntase un resultado típico de varios co mesmo deseño experimental.

Nestas mesmas condicións óptimas, e aproveitando a sensibilidade das proteínas asociadas ós dominios *raft* ó tratamento das membranas biolóxicas con ciclodextrinas, leváronse a cabo distintas análises de citometría de fluxo. Nestes novos traballos, os PBMCs foron primeiro cultivados en ausencia ou presenza de PHA durante 5 días para logo ser tratadas con metil-β-ciclodextrina (MβCD), unha molécula que elimina o colesterol das membranas celulares (Janes *et al.*, 1999; Nguyen & Hildreth, 2000) e que reduce a expresión de marcadores de zona *raft* como CD59 ou o gangliósido GM1 sen afectar ós niveis dos marcadores de rexións non-*raft* como CD71 (Salgado *et al.*, 2003).

Cando se avaliou o efecto da dextrina sobre CD45RO (Figura 24) as células sen activar (basal) amosaron unha expresión desta molécula sensiblemente afectada polo tratamento con MβCD, o que se correspondería cunha forte presenza de CD45RO en microdominios *raft*. Cando os PBMCs eran activados con PHA durante 5 días, a sensibilidade de CD45RO ó tratamento con MβCD desaparecía drasticamente, o que indicaba a existencia dun certo desprazamento de CD45RO fóra dos *rafts* lipídicos (Figura 24). Nestes experimentos os PBMCs tamén foron activados con diferentes concentracións da lectina soa ou en combinación coa interleuquina IL-12 (datos non amosados),

pero en ningún dos casos se viu unha redución clara da sensibilidade de CD45RO a M $\beta$ CD.



**Figura 24. Expresión de CD45RO en linfoblastos tratados con M $\beta$ CD.**

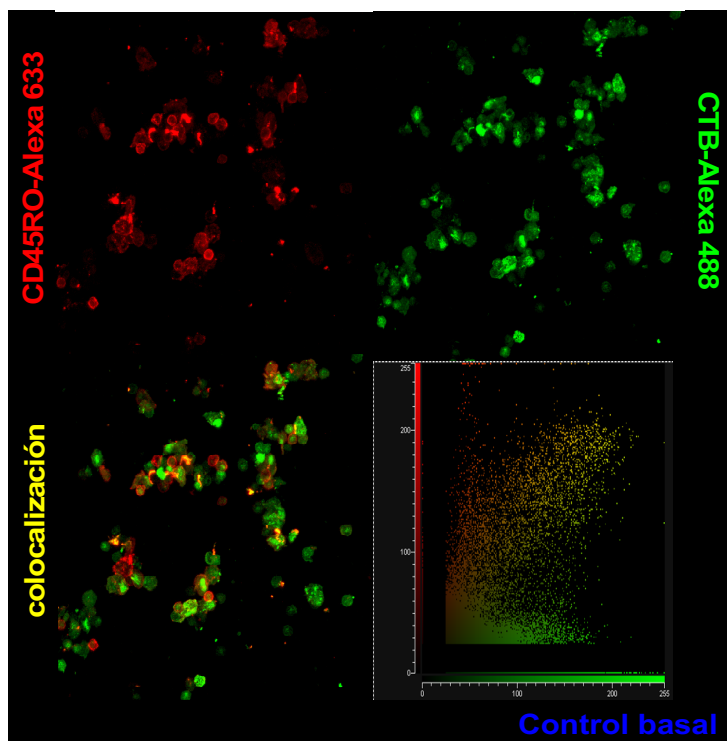
PBMCs cultivadas durante 5 días a unha densidade inicial de  $0.5 \times 10^6$  células/ml, activadas con 0 (basal) ou 2.5  $\mu$ g/ml de PHA. As células foron tratadas ou non con M $\beta$ CD e marcadas con anti-CD45RO-PE. Datos representativos de varios experimentos (n=3). Os datos presentados se corresponden ca media de triplicados  $\pm$  SD.

Pódese concluír polo tanto que PHA, un estímulo policlonal que emprega o TCR e posiblemente outros receptores de membrana, reduce os niveis de CD45RO na superficie das células e provoca un movemento desta fosfatasa fóra de microdominios *raft*, sendo ámbolos dous efectos potenciados por IL-12. Este control do número e da disposición das moléculas de CD45RO podería ser esencial tanto para a transducción de sinais a través do TCR, mediada por dianas de CD45 como as Src quinasas ou a cadea  $\zeta$  do TCR, como para o control da sinalización a través do receptor de IL-12, neste último caso ligada a substratos de CD45 como as quinasas JAK. O uso de mecanismos de sinalización comúns entre TCR e o IL-12R non só apunta a CD45RO, como é neste caso, senón que tamén foi comprobada recentemente polo noso grupo no caso de JAK2 e das MAPK Raf, MEK e ERK1/2 (Canda-Sánchez *et al.*, 2009a e 2009b).

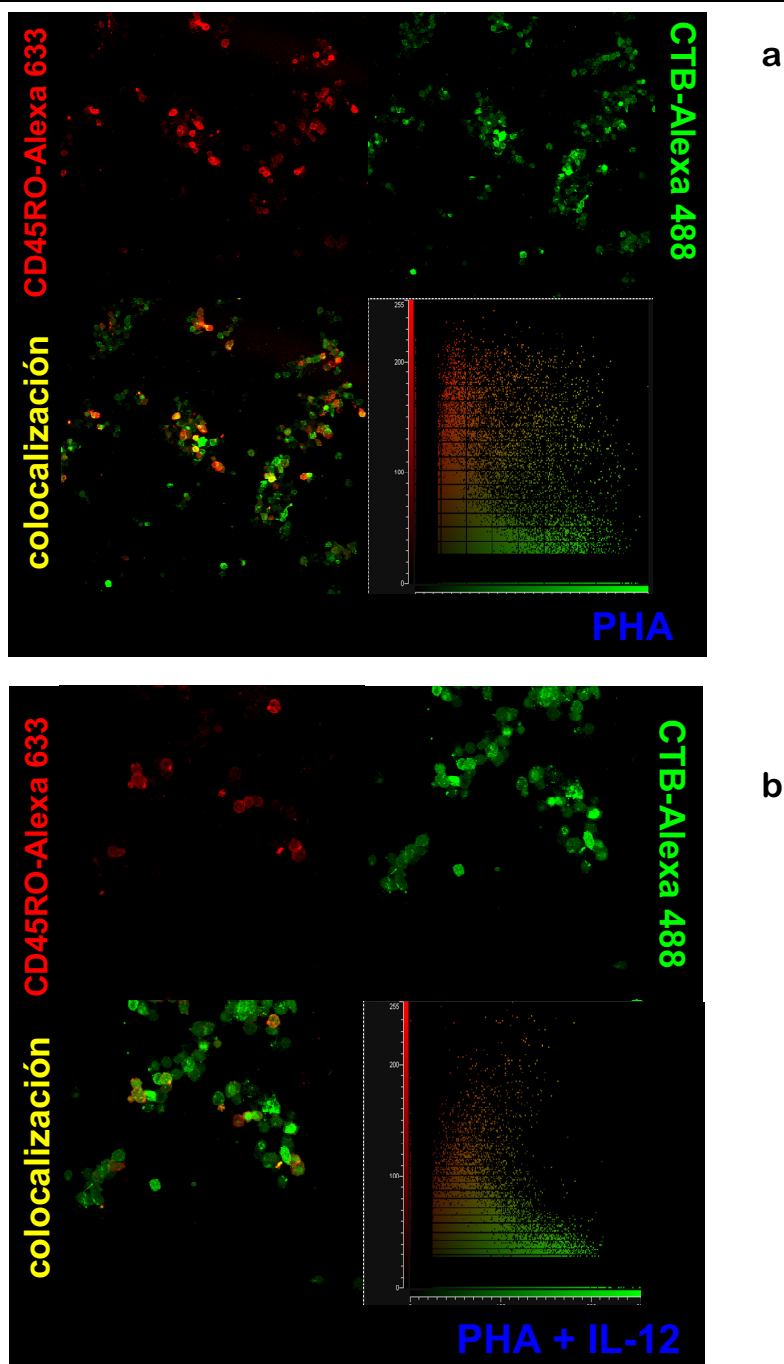
Para coñecer un pouco máis o efecto que a sinalización TCR e a IL-12 teñen sobre o posicionamento de CD45RO na membrana realizáronse unha serie de experimentos de microscopía confocal nos que foi utilizado un marcador de zona *raft*, o gangliósido GM1,

recoñecido pola subunidade B da toxina colérica (CTB-Alexa 488, verde). Para detectar a expresión de CD45 empregouse un anticorpo anti-CD45RO marcado con Alexa 633 (en vermello). O glicoesfingolípido GM1 da membrana plasmática, considerado residente en zona *raft*, é un dos marcadores máis utilizados neste tipo de experimentos (Nichols *et al.*, 2001; Badizadegan *et al.*, 2000). Polo tanto, nos casos en que CD45RO esté situado en zona *raft*, colocalizará co marcador CTB.

Na Figura 25 móstrase o resultado característico dun control basal (PBMCs sen estimulación algunha) onde se pode apreciar no citofluorograma a elevada colocalización de CD45RO co marcador de zona *raft* GM1. Isto coincide cos resultados obtidos mediante fraccionamento de membranas ou tratamento con M $\beta$ CD.



**Figura 25. Colocalización de CD45RO con GM1 en PBMCs sen estimular (control basal). Análise por microscopía confocal.** PBMCs cultivados 5 días sen ningunha activación. Marcaxe realizada con anti CD45RO-Alexa 633 (vermello) e CTB Alexa 488 (verde). A diagonal do citofluorograma (en amarelo) dá unha medida cualitativa da colocalización entre ambas moléculas.



**Figura 26. Localización de CD45RO. Análise por microscopía confocal, tratamento con PHA e PHA+IL-12.** Células cultivadas 5 días con PHA 2.5 µg/ml sen/con 2 ng/ml IL-12. Marcaxe realizada con anti CD45RO- Alexa 633 (vermello) e CTB Alexa 488 (verde). A diagonal do citofluorograma (en amarelo) dá unha medida cualitativa da colocalización entre ambas moléculas.



No caso de células tratadas con PHA, existe un menor grao de colocalización entre CD45RO e CTB (Figura 26a) con respecto ó control basal, que aínda se ve máis reducido ó tratar as células con PHA+IL-12 (Figura 26b). Isto é un efecto esperado, xa que é unha demostración máis de que a IL-12 despraza a molécula de CD45RO fóra de zona *raft*, polo que non terá proximidade espacial con ningún marcador de dita zona.

#### 4. PROLIFERACIÓN CELULAR: IL-12 E ADA

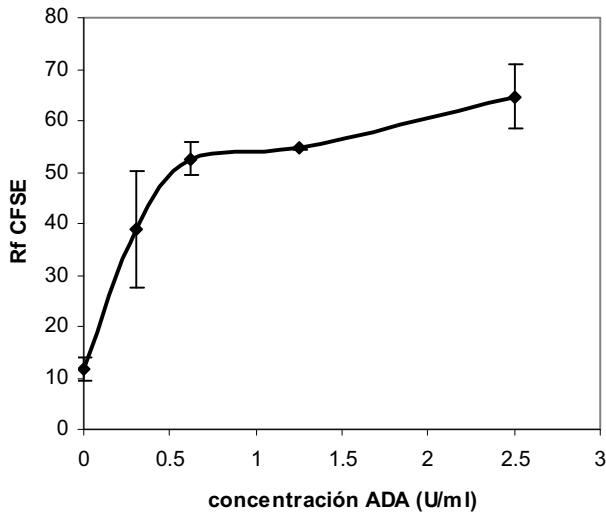
Como xa se comentou con anterioridade, a IL-12 ten un efecto proliferativo en células T ou NK pero só no caso de que estas estén previamente activadas pola vía TCR/CD3, é dicir, precísase unha estimulación previa mediante PHA, aloantíxenos, anticorpos anti-CD3, diésteres de forbol ou IL-2 (Trinchieri, 1995). Isto pode ser debido a que IL-12 só pode transmitir sinais proliferativos a través da cadea  $\beta 2$  do seu receptor (Rogge *et al.*, 1997; Szabo *et al.*, 1997) e necesítase activación vía TCR para a expresión desta cadea (Ahlers *et al.*, 2001). A proliferación inducida por IL-12 é un efecto moi coñecido (Kobayashi *et al.*, 1989; Gately *et al.*, 1991; Perussia *et al.*, 1992; Desai *et al.*, 1992) pero pouco estudado: está reforzado por citoquinas como a IL-2 e incluso por outras en principio antagónicas como a IL-4 e a IL-7 (Kriegel *et al.*, 2006) (típicas da resposta Th2) mediante un proceso no que participa a STAT3. Sen embargo, non se coñece un mecanismo de transducción de sinal unicamente asociado á IL-12.

Debido á súa relación coas moléculas obxecto de estudo neste traballo (CD45RO, CD26 e IL-12), como xa foi amplamente comentado na introducción (ver páxina 50), estudiouse o efecto causado por ADA (adenosina deaminasa), responsable de catalizar o paso de adenosina a inosina. A adenosina é un forte inhibidor da proliferación celular así como da produción de citoquinas (Smith *et al.*, 1971; Green & Chan, 1973), efecto que é potenciado en presenza de inhibidores de ADA, polo que

sería esperable que a presenza do encima que degrada a adenosina impedise o efecto inhibitor desta última molécula. Sen embargo, o efecto de ADA sobre a activación celular é controvertido. ADA exóxena pode aumentar a proliferación de células CD4<sup>+</sup> previamente estimuladas con anti-CD3, incluso en presenza de inhibidores de ADA (Martin *et al.*, 1995) e tamén aumenta o nivel de Ca<sup>+2</sup> intracelular, indicativo de que se inician procesos de sinalización (Franco *et al.*, 1998). Sabemos que a inhibición de ADA evita procesos propios de células T activadas como a produción de IL-2 ou a expresión de IL-2R (Ruers *et al.*, 1987). Ademais, a asociación de ADA con CD26 está involucrada na capacidade de CD26 para promover a proliferación e a produción de citoquinas, pero algúns autores sosteñen que para observar o efecto proliferador de ADA é necesaria a presenza dun sinal primario a través do TCR (por exemplo, un superantíxeno como a enterotoxina A de estafilococo/SEA, -Pacheco *et al.*, 2005- ou unha activide adenosina deaminasa intacta, Dong *et al.*, 1996).

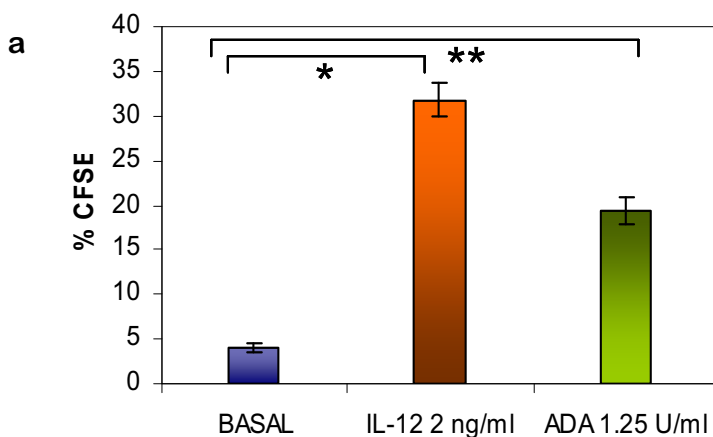
Do mesmo xeito que se fixo cos experimentos anteriores, optimizáronse para os estudos con ADA tanto a densidade celular de partida como a concentración de PHA requirida no cultivo (datos non amosados). Como norma xeral utilizamos 2.5 µg/ml de PHA e unha densidade de 0.25x10<sup>6</sup> células/ml. As medidas de proliferación fixéronse utilizando CFSE (xa introducido na páxina 79), que nos permite monitorizar o número de divisións celulares, sendo o valor de IMF de CFSE inversamente proporcional ó grao de proliferación celular.

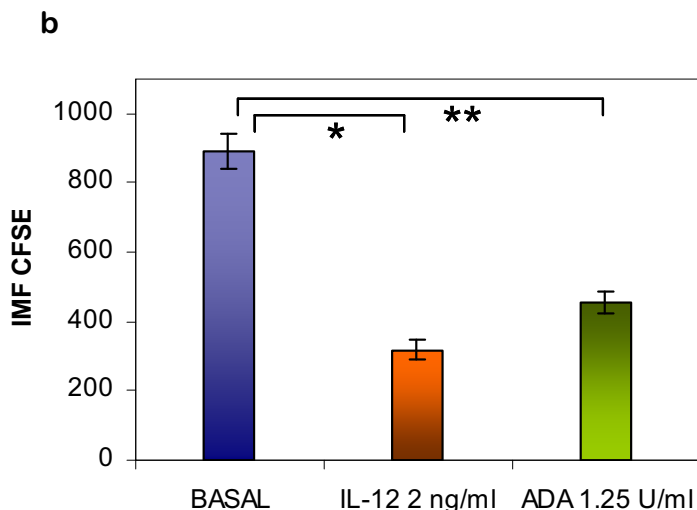
Para avanzar no tema, o primeiro que fixemos foi determinar a concentración idónea de ADA nos nosos cultivos de PBMCs, a fin de estudar o seu efecto na proliferación destas células. Nos estudos de dose-resposta (Figura 27) obsérvouse que a partir dunha concentración de 1 U/ml de ADA no cultivo a porcentaxe de células que polo menos se dividían unha vez acadaba unha fase de meseta.



**Figura 27. Efecto de concentraciones crecientes de ADA exógena na proliferación de PBMCs humanos.** PBMCs foron purificados, marcados con 5  $\mu$ M CFSE e cultivados 5 días a unha densidade celular inicial de  $0.5 \times 10^6$  clas/ml. As células foron estimuladas con 2.5  $\mu$ g/ml PHA e as concentracións indicadas de ADA. Os datos (Rf CFSE, *calculated responder frequency*) correspóndense coa porcentaxe de células respondedoras que sufriron polo menos unha ronda de división, e veñen expresados como media  $\pm$ SD de 5 experimentos.

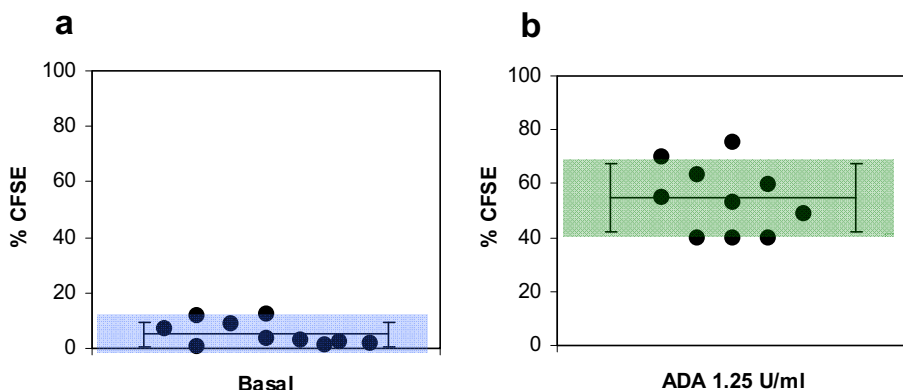
Á vista destes resultados, decidimos traballar cunha concentración de ADA de 1,25 U/ml en cultivo, demostrando que nestas condicións ADA é capaz de coestimular a proliferación dos linfocitos T de xeito significativo (Figuras 28 e 29), feito medible tanto na porcentaxe de células dividiron máis dunha vez como mediante a redución da intensidade media de fluorescencia de CFSE en ditas células.





**Figura 28. Comparativa do efecto dos tratamentos con ADA e con IL-12 sobre o grao de proliferación celular inducida por PHA.** PBMCs marcadas con 5  $\mu$ M CFSE e cultivadas durante 5 días, a unha densidade celular inicial de  $0.5 \times 10^6$  células/ml. As condicións de activación foron: **Basal**, 2.5  $\mu$ g/ml PHA; **IL-12**, 2.5  $\mu$ g/ml PHA + 2 ng/ml IL-12; **ADA**, 2.5  $\mu$ g/ml PHA + 1.25 U/ml ADA. Os datos presentados correspóndense coa media de  $n=10$  experimentos  $\pm$ SD. **a)** porcentaxe de células que sufriron máis dunha ronda de división celular. \* e \*\* indican que existen diferencias significativas entre os tratamentos cun p-valor=0.007823. **b)** IMF de CFSE. \* e \*\* indican que existen diferencias significativas entre os tratamentos cun valor  $p=0.003906$  (Basal vs. IL-12) e  $p=0.01953$  (Basal vs. ADA) (probabilidade do 99%, contraste de Wilcoxon para mostrase pareadas).

Para maior claridade, na Figura 29 recóllense resultados doutros 10 experimentos independentes onde a proliferación dos linfocitos T, coestimulados (ADA 1.25 U/ml) ou non (Basal) con ADA esóxena, foi expresada novamente como porcentaxe de células en división. Desta maneira, obsérvase perfectamente que a adición de ADA no cultivo provoca un aumento dun 50% na proliferación celular causada pola lectina.



**Figura 29. Porcentaxe de aumento da proliferación de linfocitos T activados en presenza de 1.25 U/ml ADA.** PBMCs cultivadas nas condicións descritas na Figura 28. Na figura representáanse os datos da porcentaxe de células que se dividiron polo menos unha vez en ausencia (a) ou presenza (b) de ADA 1.25 U/ml. Os datos individuais son presentados na gráfica, así como a media de cada grupo (liña horizontal, 3,98 para cultivo basal, 54,84 en cultivo con ADA), indicando as barras laterais e as cores azul (a) e verde (b) a desviación estándar da media. As diferenzas atopadas entre ambos tratamentos son significativas para un 99% de probabilidade, cun valor  $p=0.001953$  no contraste de Wilcoxon para mostras pareadas.

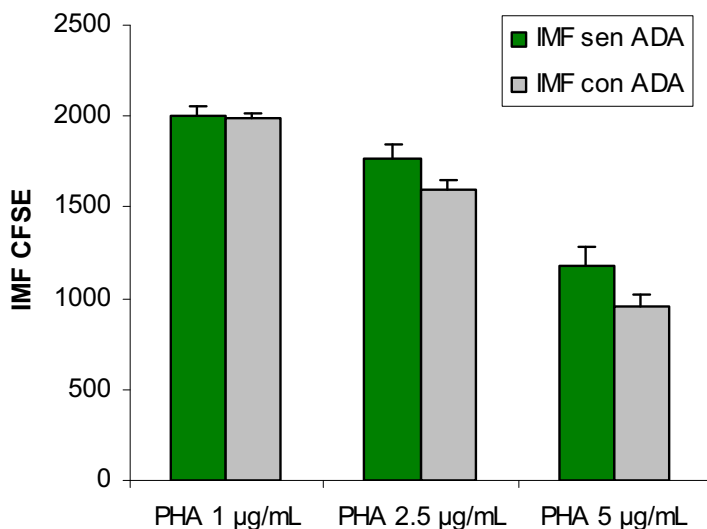
O efecto mitoxénico de ADA non adoita ser tan marcado como o da IL-12, aínda que ten características similares (Figura 28). Unha hipótese posible é que este efecto podería estar relacionado cun posible papel mediador de IL-12 no aumento da proliferación nos linfocitos observado con ADA. Aínda que non comprobada todavía, sábese por exemplo que a coestimulación dos linfocitos T con ADA esóxena xenera un incremento de certas citoquinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 no medio (Pacheco *et al.*, 2005), polo que IL-12 podería ser un destes factores solubles tamén aumentados.

Por outra banda, ADA é unha molécula intracelular no seu 90%, que é liberada ó exterior cando a célula se rompe; por exemplo, como resposta a un patóxeno intracelular que provoque unha anemia hemolítica (ex. estreptococo). Neste caso, e como consecuencia dos

maiores niveis de ADA en plasma, poderían liberarse citoquinas de tipo Th1 (caso da propia IL-12), máis apropiadas para a defensa fronte a este tipo de patóxenos intracelulares. Isto aumentaría a proliferación celular e a resposta do sistema inmunolóxico. Teríamos así a ADA como un axente polarizador do fenotipo dos linfocitos T cara un fenotipo Th1 e como un paso anterior á produción de IL-12, que sería a verdadeira mediadora dos efectos observados.

#### 4.1 Relación entre PHA e o efecto proliferador de ADA

Aínda que a concentración de PHA coa que se traballou na maioría dos experimentos deste traballo foi 2.5 µg/ml, estudiamos se a variación na dose deste mitóxeno influía na proliferación causada por ADA, resultados que se amosan na Figura 30. Como se viu con anterioridade, maiores cantidades de PHA provocan unha maior proliferación (tal como ocorre coa IL-12).



**Figura 30. Experimentos de dose resposta con PHA: efecto coestimulador de ADA esóxena sobre a proliferación celular.** PBMCs foron marcadas con CFSE 5µM e cultivadas a unha densidade celular inicial de  $0.5 \times 10^6$  células/ml durante 5 días, con ou sen 1.25 U/ml ADA, e coas concentracións de PHA indicadas. Os datos representan media  $\pm$  SD de 3 experimentos independentes con PBMCs procedentes de diferentes doantes.

Á vista destes resultados optamos unha vez máis por traballar con unha concentración de 2.5 µg/ml de PHA, xa que concentracións máis altas do mitóxeno poden provocar unha activación que enmascare os tratamentos coestimuladores cos que se trata o cultivo.

## 5. Efecto de ADA esóxena sobre a expresión de CD45RO

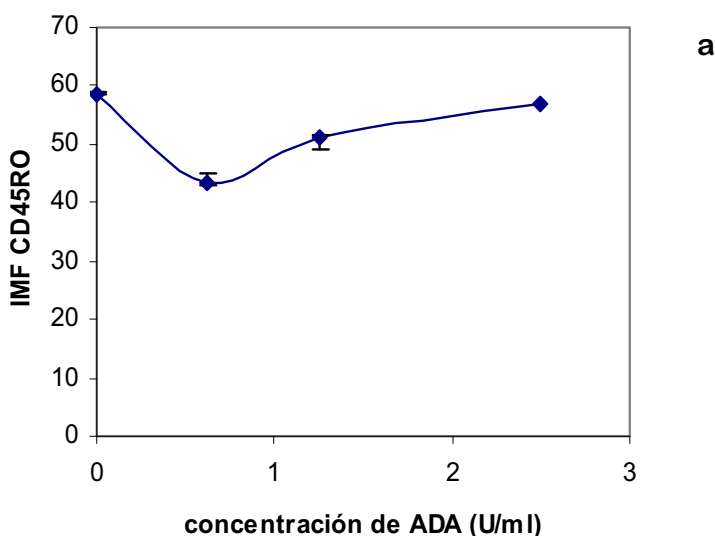
Dentro da diferenciación das poboacións CD4<sup>+</sup>, os subconxuntos máis importantes son as Th1 e as Th2, que son as responsables do mecanismo de resposta inmune máis apropiado para combatir distintos patóxenos invasores, tendo cada un deles un patrón específico de citoquinas. Como xa se comentou, a resposta Th1 está caracterizada pola secreción de IFN-γ e IL-2, mentres as principais citoquinas que interveñen na resposta Th2 son a IL-4 e a IL-10. Viuse que cando ADA estaba presente aumentaba a secreción de IFN-γ, TNF-α e IL-6 mentres que IL-2, IL-4 e IL-10 non presentaban variacións (Pacheco *et al.*, 2005), do que se deduce que este efecto coestimulador de ADA débese a que provoca un aumento da expresión das citoquinas proinflamatorias Th1 - igual que ocorre no caso de CD26 (Cordero *et al.*, 1997a, 1998)- posiblemente relacionado en parte coa súa asociación co CD26 na superficie das células T.

O noso grupo demostrou o efecto positivo que a IL-12 (citoquina que promove o fenotipo Th1) exercía sobre a expresión e a actividade de CD26 en linfocitos humanos activados, independentemente da acción da IL-2 (Salgado *et al.*, 1999). ADA aparece asociada a CD26 na superficie celular (Kameoka *et al.*, 1993, De Meester *et al.*, 1994), iniciando, según algúns investigadores, a transducción de sinal cara o interior das células T, proceso no que a interacción CD26-CD45RO tamén parece ser importante. De feito, a deficiencia de calquera das dúas moléculas (ADA e CD45RO) provoca inmunodeficiencia combinada severa, unha enfermidade que se caracteriza pola carencia de linfocitos T e B. Coñecendo o efecto que IL-12 exerce sobre a proliferación celular e

#### 4. Resultados e discusión

sobre a expresión de CD45RO, como se vén amosando neste traballo, tratamos de establecer unha analoxía co aumento de proliferación causado por ADA (xa visto) e agora co efecto que esta enzima do metabolismo das purinas puidera ter sobre os niveis de CD45RO, xa que tanto ADA como CD45RO están relacionadas entre si a través de CD26.

Dos resultados das figuras 27 e 28 concluímos que a concentración de traballo de ADA debía ser 1,25 U/ml para obter un bo efecto modulador da proliferación celular. Comprobouse entón se nestes rangos de concentración obtiñamos algún efecto sobre a expresión de CD45RO, observando unha redución na fluorescencia de CD45RO por efecto de ADA (Figura 31a). Esta redución da IMF de CD45RO foi tamén reproducida en experimentos de microscopía confocal (Figuras 31b e c).



**Figura 31. Efecto da exposición a ADA exóxena sobre a expresión de CD45RO.** a) PBMCs cultivados 5 días con 2.5 µg/ml PHA en presenza das concentracións indicadas de ADA e marcadas con anti-CD45RO-PE. Os resultados correspóndense coa media de 3 experimentos  $\pm$ SD. b) e c) (páxina seguinte) imaxes de microscopía confocal de PBMCs cultivadas nas mesmas condicións que en a) e onde se amosa o efecto da costimulación con 1.25 U/ml de ADA sobre a expresión de CD45RO (verde) e CD26 (vermello), así como sobre a colocalización entre CD26 e CD45RO (amarelo). b) activación das células con PHA. c) activación con PHA+ADA.



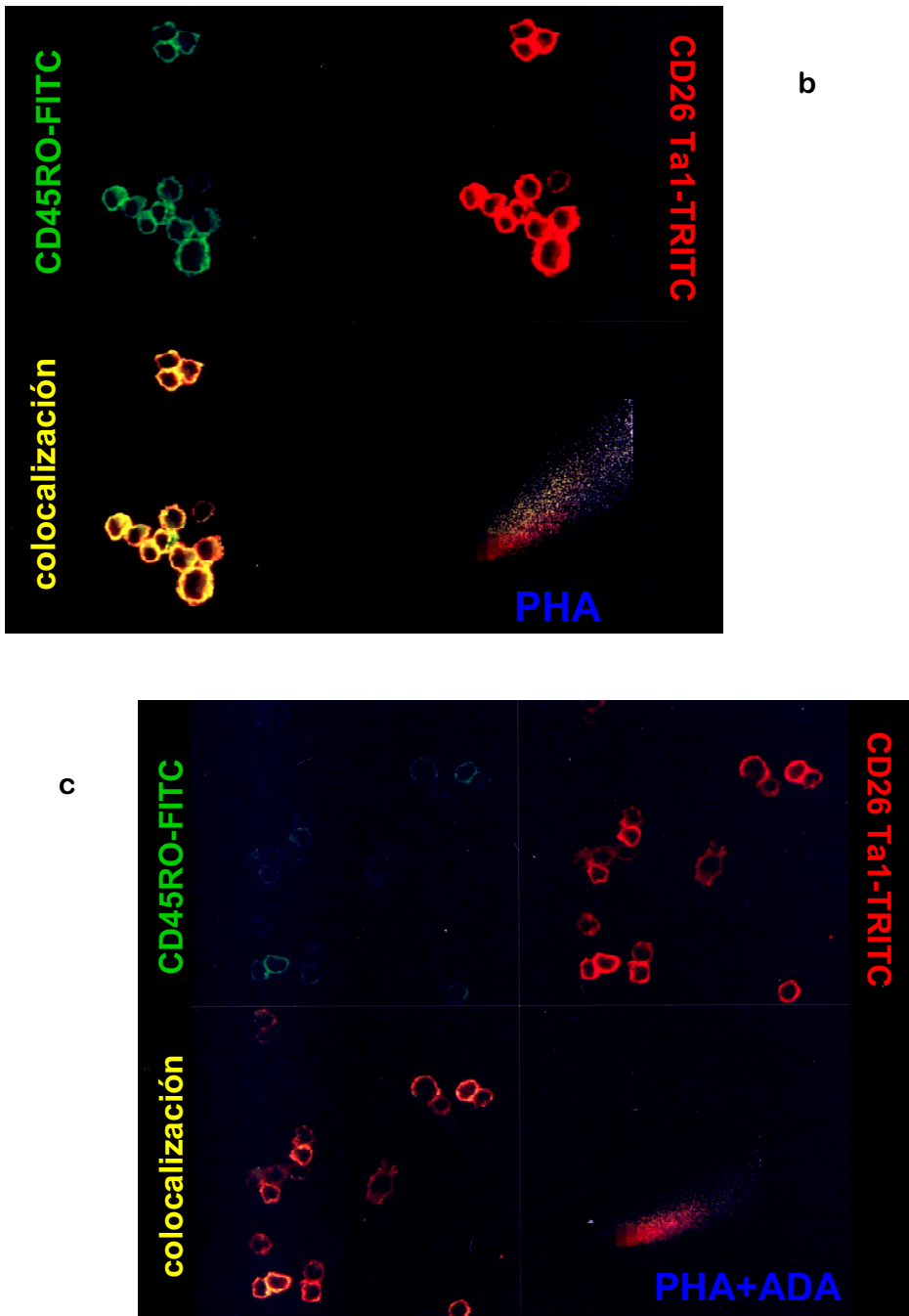
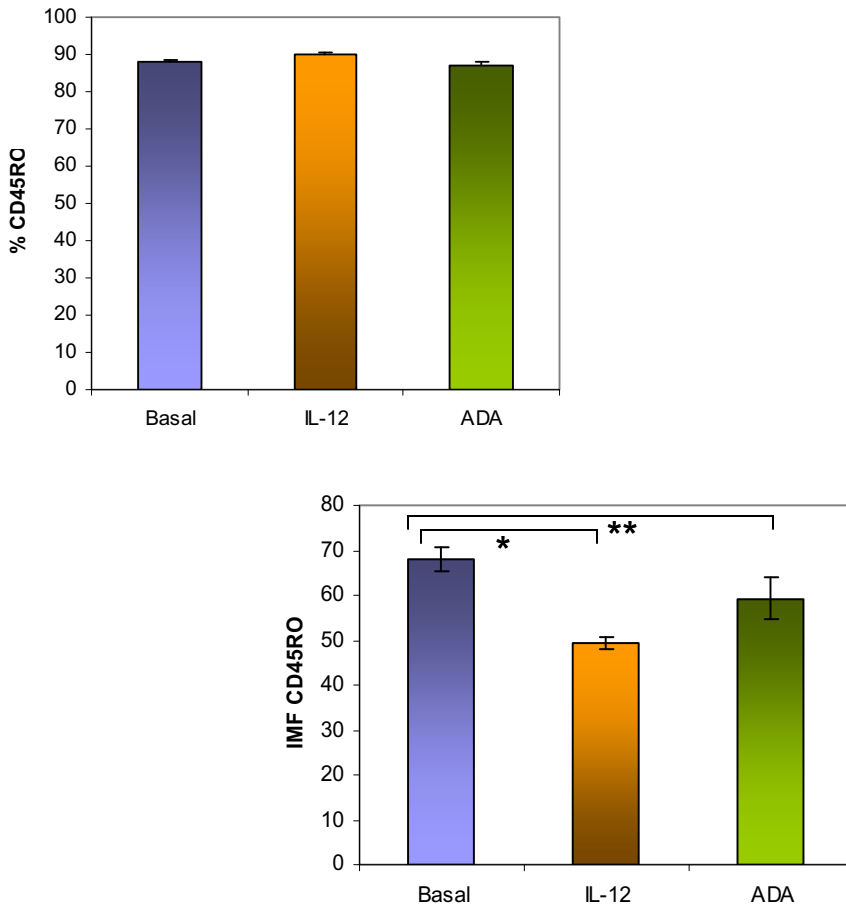


Figura 31. (continuación)

O efecto de ADA esóxena sobre CD45RO é apreciable sobre todo desde o día 3 do cultivo (datos non amosados), un momento a partir do cal aumenta tamén de forma sensible a expresión de ADA endóxena (polo que haberá un maior número de moléculas de ADA unidas a CD26). Sábese que a interacción de ADA con CD26 pode evitar o recoñecemento da última das moléculas por algúns anticorpos antiCD26 como TA5.9 (De Meester *et al.*, 1995, Cordero *et al.*, 2001a). Polo tanto, unha hipótese razoable era, nese momento da investigación, que a medida que aumentaba a cantidade de ADA (ben de xeito endógeno ou esóxeno) esta enzima se unise cada vez máis a CD26, diminuindo desta maneira a posibilidade de unión entre o anticorpo anti-CD45RO-PE e CD45RO. Como se ve na Figura 31a, baixas concentracións (0.625 e 1.25 U/ml) de ADA reducen sensiblemente a expresión de CD45RO con respecto ó cultivo basal no que só se engadiu PHA. Sen embargo, ó aumentar a concentración a 2.5 U/ml, deixa de apreciarse este efecto, algo que pode ser debido á actividade enzimática de ADA e non esperable dun fenómeno competitivo entre anti-CD45RO e ADA.

Polo tanto, nunha primeira aproximación, a medición da expresión de CD45RO por citometría de fluxo en PBMCs activados con PHA+ADA, indicábanos que ADA tiña un efecto similar ó da IL-12 sobre a expresión de CD45RO, reducindo tanto a intensidade media de fluorescencia como a porcentaxe de células marcadas con anti-CD45RO-PE, aínda que cuantitativamente de menor importancia (Figura 32).

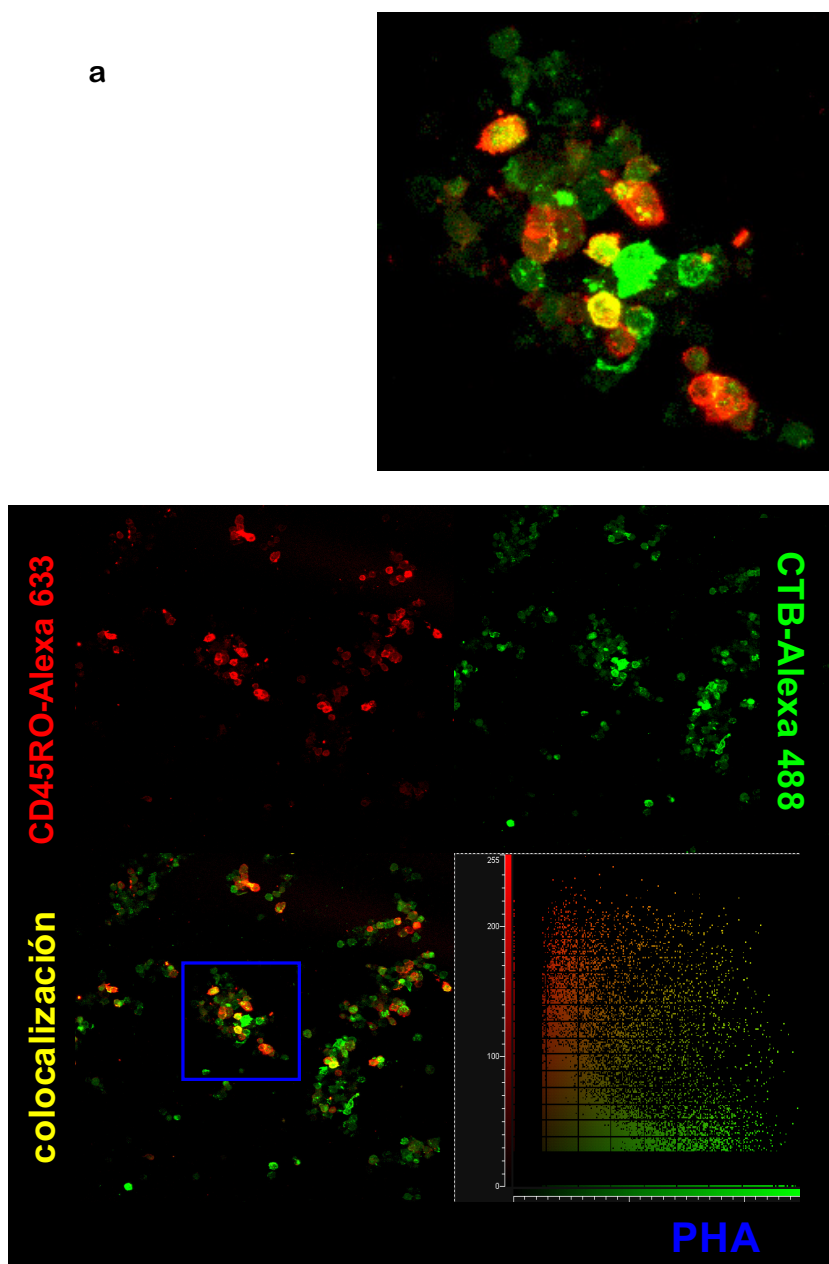
Este efecto pode deberse a unha liberación de ADA inducida por unha reacción de inmunidade innata, como xa se comentou, que podería provocar unha resposta de tipo Th1 mediada pola liberación de IL-12 polas APCs.



**Figura 32. Efecto de ADA sobre a expresión de CD45RO.** PBMCs cultivadas durante 5 días, a unha densidade inicial de  $0.5 \times 10^6$  células/ml. **Basal**, 2.5 µg/ml PHA; **IL-12**, 2.5 µg/ml PHA + 2 ng/ml IL-12; **ADA**, 2.5 µg/ml PHA + 1.25 U/ml ADA (preincubadas 1 hora). A marcaxe inmunofluorescente levouse a cabo no quinto día con anti-CD45RO-PE. Os datos corresponden coa media de n=9 experimentos  $\pm$ SD. \* e \*\* representan diferencias significativas entre os tratamentos con IL-12 e ADA respecto ó basal cun p-valor=0.003906 para un 99% de probabilidade (Contraste de Wilcoxon para mostrase pareadas).

Por outra banda, plantexámonos comprobar mediante microscopía confocal se a diminución da expresión de CD45RO nas células causada por ADA estaba asociado tamén cun cambio na localización da proteína con respecto a marcadores de *rafts* lipídicos como GM1.

Así, na figura 33a, co tratamento basal (células activadas 5 días con PHA), apréciase novamente unha forte presenza de CD45RO (en vermello) en zona *raft*, que vén determinada pola súa intensa colocalización (amarelo) co marcador GM1 (CTB-Alexa 488; verde) Este enriquecemento en moléculas de CD45RO vese alterada ó tratar as células con ADA ou IL-12 (Figuras 33b e 33c, respectivamente). No caso do tratamento con IL-12 (Figura 33c) das células activadas con PHA, a redución da expresión de CD45RO é moi evidente, así como tamén o é a diminución do número de zonas de colocalización co marcador de zona *raft*. Este efecto, aínda que con menor intensidade, repítese nas mostras coestimuladas con ADA (Figura 33b), corroborando así os resultados obtidos anteriormente mediante citometría de fluxo e indicando que ADA é capaz de producir un desprazamento de CD45RO fóra dos *rafts* lipídicos.



**Figura 33. Localización de CD45RO. Análise por microscopía confocal.** Blastos cultivados 5 días con 2.5 µg/ml PHA (a) PHA 2.5 µg/ml + 1.25 U/ml ADA (b) ou PHA 2.5 µg/ml + 2 ng/ml IL-12 (c). Marcaxe realizada con anti CD45RO-Alexa 633 (vermello) e CTB Alexa 488 (verde). A diagonal do citofluorograma (en amarelo) dá unha medida cualitativa da colocalización entre ambas moléculas. A zona recadrada en azul aparece aumentada na parte superior da figura.

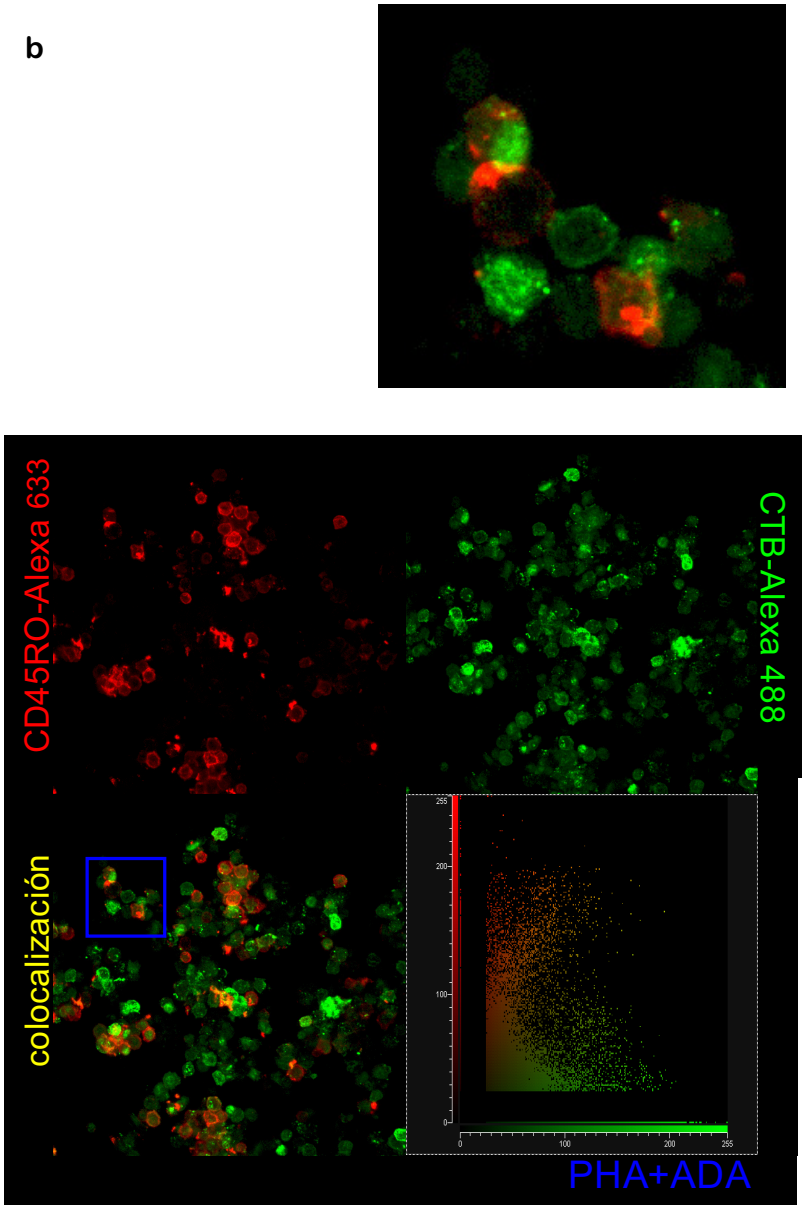


Figura 33 (continuación).

c

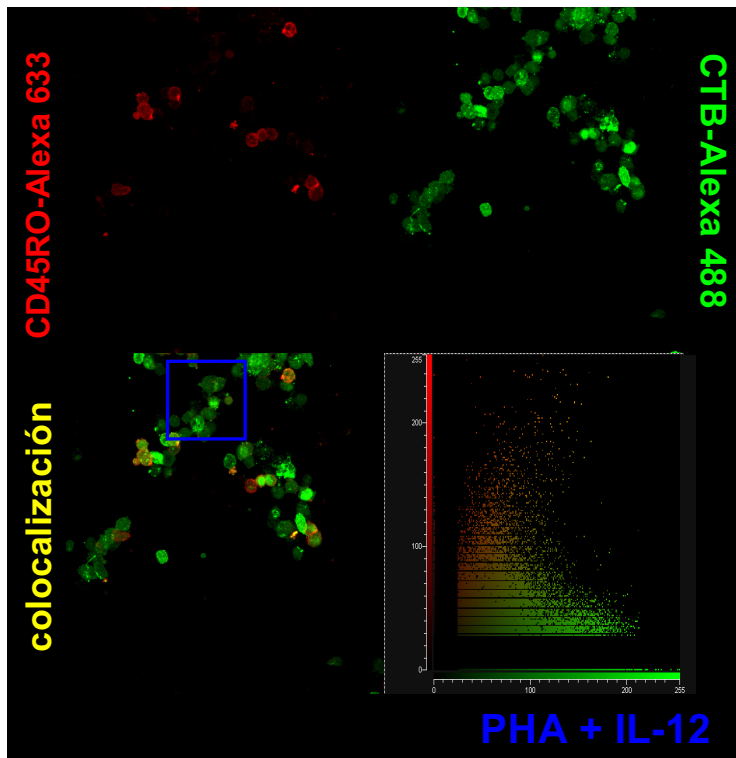
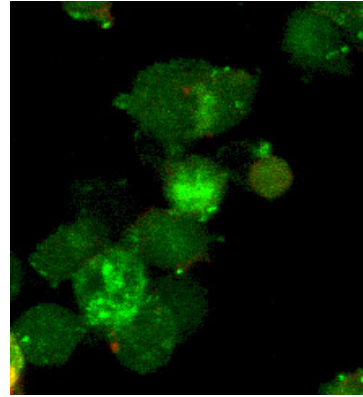


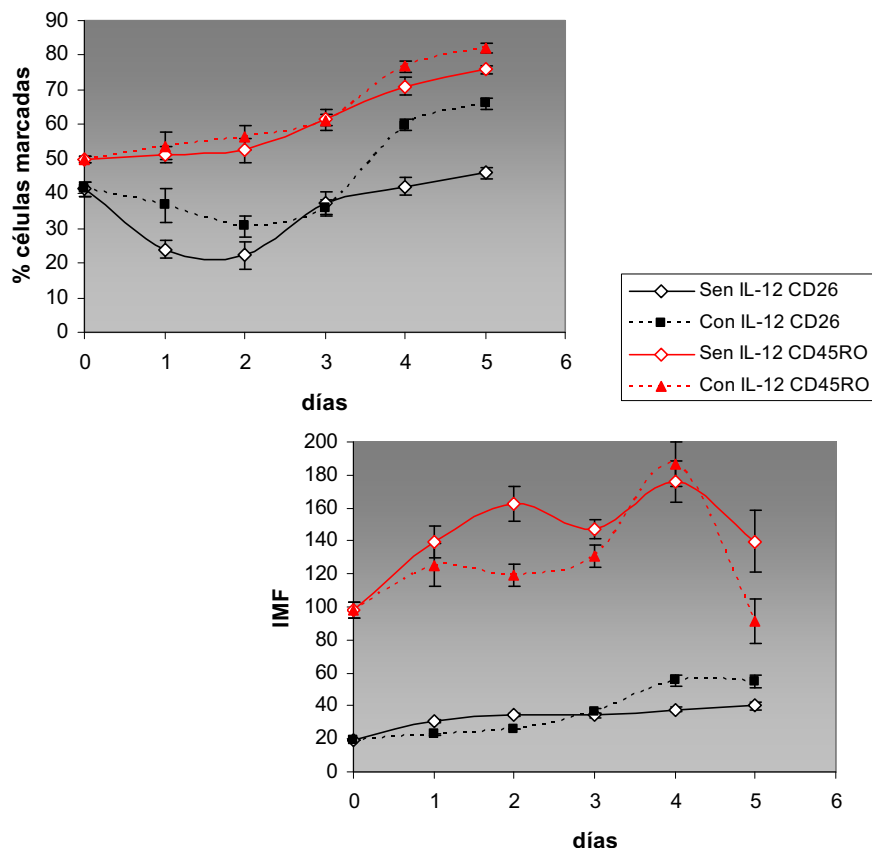
Figura 33 (continuación).

### 5.1 Estudo cinético da expresión de CD45RO e CD26 mediada por IL-12

Os efectos paracrinós ou autocrinós provocados polas citoquinas como IL-12 non son puntuais, senón que adoitan ter unha cinética no tempo na que se operan cambios graduais nas células diana xa desde o momento da interacción da citoquina cos receptores específicos. Na maioría dos experimentos realizados, os PBMCs cultivábanse durante 5 días en medio completo suplementado con diferentes estímulos, sendo neste último día cando eran recollidos e marcados fluorescentemente con anticorpos para posteriormente obter os datos correspondentes no citómetro. Nunha nova serie de experimentos, plantexámonos facer un seguimento do efecto da coestimulación con IL-12 sobre os niveis de expresión de CD45RO e CD26, facendo lecturas a diferentes momentos do cultivo (1, 2, 3, 4 e 5 días) para así observar a cinética do proceso.

Como xa se observara en experimentos anteriores, a diminución de IMF de CD45RO debida ó efecto da IL-12 foi moi evidente no día 5. Pero, á vista dos resultados da Figura 34, podemos engadir que este fenómeno era tamén observable desde o primeiro momento do cultivo, dado que xa no día 1 as células coestimuladas con IL-12 presentaban unha IMF de CD45RO menor que o cultivo basal (sen IL-12). Só no día 4 esta tendencia parecía revertir, observándose de novo un descenso da intensidade media de fluorescencia para CD45RO no quinto día. Polo tanto, parece que a expresión de CD45RO segue unha cinética bimodal, e que a modulación que IL-12 exerce sobre ela ocorre en dous momentos ou fases concretas: ó segundo e ó quinto día. Hai que ter en conta que a primeira destas fases coincide co momento de máxima expresión do IL-12R $\beta$ 2, responsable de moitos dos efectos da citoquina, que ten lugar entre os días 2 e 3 despois da activación por PHA, sendo esta expresión nula nos linfocitos non activados (Trinchieri, 2003; Watford *et al.*, 2003, Canda-Sánchez *et al.*, 2009a).





**Figura 34. Cinética da expresión de CD45RO e CD26 mediada pola IL-12 (porcentaxe e IMF).** PBMCs estimuladas con 2.5 µg/ml PHA en presenza/ausencia de IL-12, cultivadas durante 5 días en medio completo a unha densidade de  $0.5 \times 10^6$  células/ml. Cada 24h, recolléronse alícuotas de cada condición que foron lavadas e fixadas con PFA 1% en PBS, conservándose a 4°C ata marcaxe, realizada con anti CD26 TP1/16-FITC e anti-CD45RO-PE UCHL-1. Triplicados  $\pm$  SD de n=3.

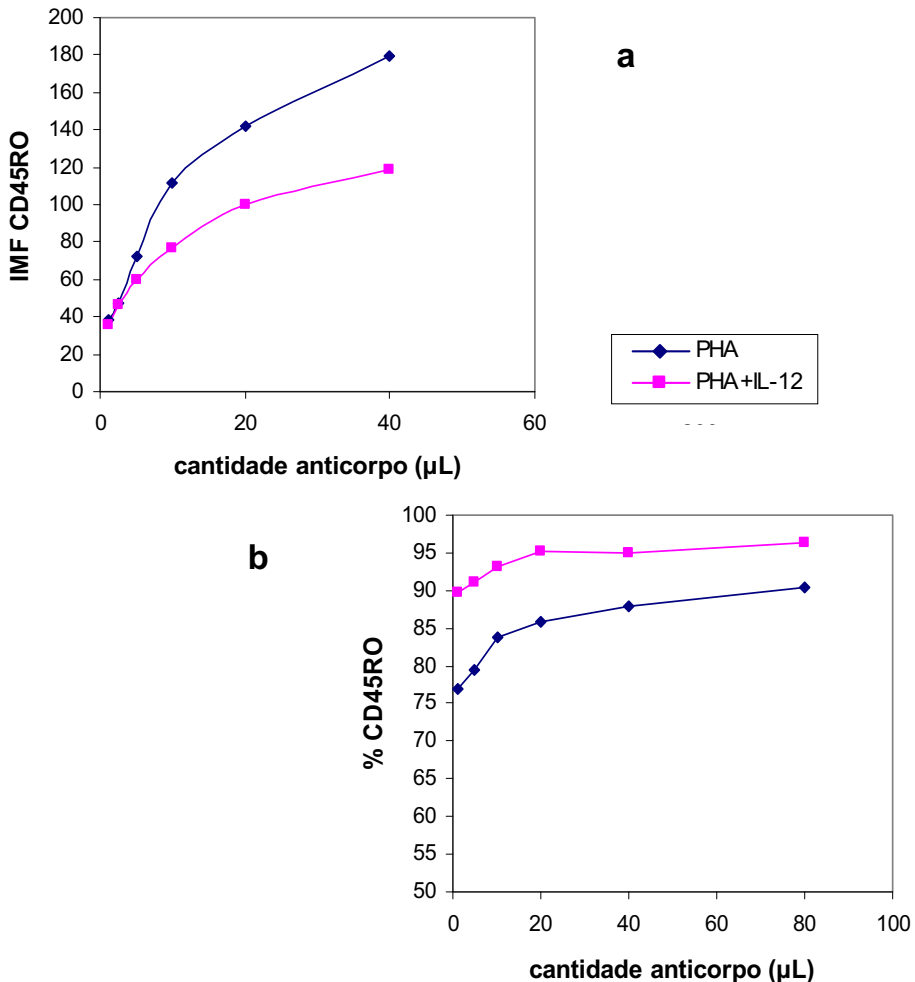
É probable que nesta primeira etapa a modulación negativa de CD45RO por IL-12 non esté mediada polo CD26 de nova síntese, xa que os efectos da citocina sobre os niveis da peptidasa teñen lugar fundamentalmente a nivel traduccional e aínda non tiveron lugar, o que non descarta unha implicación doutros *pool*s de CD26.

A segunda das etapas nas que a IL-12 reduce a IMF de CD45RO, a que ten lugar no quinto día, correspóndese co momento de máxima

diferencia de niveis de CD26 entre os blastos tratados ou non con IL-12 (Figura 34). Unha explicación posible para o descenso da IMF de CD45RO nesta segunda etapa sería, como xa se comentou anteriormente, a dificultade estérica que podería atopar o anticorpo anti-CD45RO para acceder ó seu epitopo. Isto podería vir dado polo incremento da cantidade de CD26 na superficie dos blastos coestimulados con IL-12, pero tamén pola maior proximidade física entre CD26 (ou o seu ligando ADA) con CD45RO (Salgado *et al.*, 2003), polo que podería verse dificultada a unión do anti-CD45RO ás células (reducindo a IMF). Por outra banda, tamén habería que ter en conta a activación que IL-12 provoca nas PBMCs, que revirte nunha maior proliferación celular (Trinchieri, 2003; Langrish *et al.*, 2004) e, polo tanto, nun maior número de células ó final do cultivo. Neste caso, a cantidade de anticorpo anti-CD45RO utilizada (10-20  $\mu$ l/test) podería non ser suficiente para saturar os epitopos de CD45RO dispoñibles nese gran número de linfocitos, causando tamén o descenso de IMF de CD45RO.

Coa fin de profundizar nestas posibilidades, realizáronse experimentos nos que se marcou un número idéntico de blastos (ben activados con PHA ou ben con PHA+IL-12) con concentracións crecentes do anticorpo anti-CD45RO UCHL-1. O obxectivo era comprobar se maiores concentracións do anticorpo farían desaparecer o efecto de IL-12 sobre CD45RO, e ver tamén se o fenómeno podería estar causado por un número máis elevado de células nos tubos de citometría pertencentes as células coestimuladas con IL-12. Como se ve na Figura 35a, a porcentaxe de células marcadas con anti-CD45RO-PE xa é moi alta coa concentración de traballo utilizada, acadando case o 100% a medida que se aumenta a cantidade de anticorpo (ata 80  $\mu$ l/test). Este feito non sorprende se pensamos que a maioría dos antíxenos CD45RO dispoñibles estarían saturados polo anticorpo anti-CD45RO-PE. No caso do valor de intensidade de fluorescencia (Figura 35b), non se acadou a saturación que se agardaba, se non que pola contra parece que canta

máis cantidade de anticorpo se engadía, máis diferenza existía entre as células tratadas con IL-12 e as que non o estaban. Os resultados apuntaban así a que, aínda que nos experimentos anteriores houbera unha diferenza no número de células a favor dos blastos coestimulados con IL-12, a menor intensidade de CD45RO nestes cultivos non se debía a este feito, xa que a IMF de CD45RO seguía sendo máis baixa nas células tratadas con IL-12 aínda que houbera exactamente o mesmo número de células durante a marcaxe.



**Figura 35. Cinética de saturación de CD45RO empregando o anticorpo monoclonal anti CD45RO (UCHL-1).** PBMCs cultivadas durante 5 días e activadas con 2.5 μg/ml PHA en presenza ou non de 2ng/ml de IL-12 foron contadas e depositadas en tubos de citometría ( $1 \times 10^6$  células/tubo) antes da marcaxe. Datos amosados en porcentaxes de células marcadas (%) e intensidade media de fluorescencia (IMF).

Según os experimentos do noso grupo, unha maior proximidade física entre CD26 (ou ADA) con CD45RO xenerada pola coestimulación con IL-12 causaría un impedimento estérico para que CD45RO interaccionase co seu anticorpo UCHL-1. Se isto é así, ó engadir maiores cantidades de anticorpo, a competencia quedaría desprazada cara o lado do anticorpo, xa que ó estar a concentración saturante sería máis probable que se unise ó CD45RO. Sen embargo, segundo se pode ver na Figura 35, ó engadir máis cantidade do anticorpo non se igualan as IMFs de CD45RO nos blastos PHA ou PHA+IL-12.

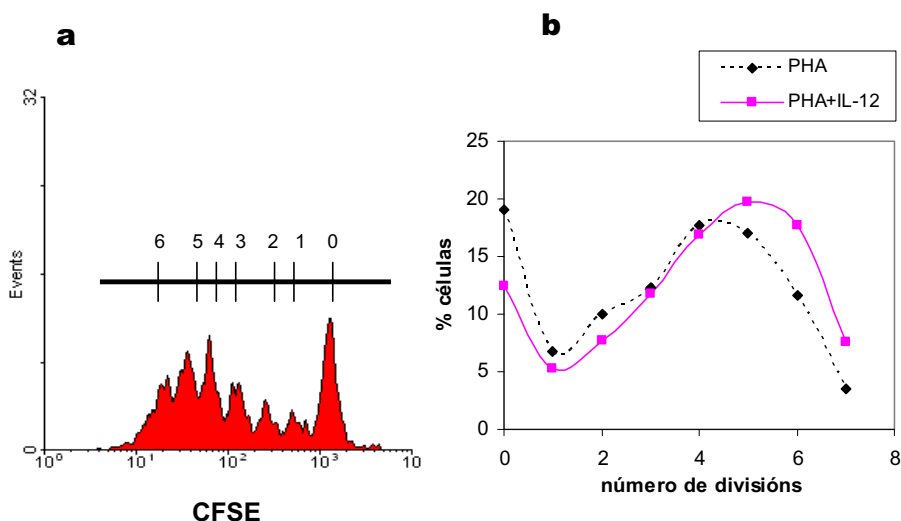
Por outra banda, cando a expresión de CD26 é inducida mediante cultivo dos PBMCs con PHA durante 5 días, e ditas células son lavadas e incubadas durante un curto período de tempo con diferentes concentracións de ADA esóxena inmediatamente antes da marcaxe inmunofluorescente, a IMF da marcaxe co anticorpo anti-CD26 TA5.9 vese reducida (Cordero *et al.*, 2001a), pero a IMF correspondente ó anticorpo anti-CD45RO non se ve afectada (datos non amosados). Polo tanto, estes datos e os recollidos na Figura 35 parecen apuntar noutra dirección distinta á do impedimento estérico.

### **5.2 Relación co tamaño celular e co número de divisións**

Co obxectivo de intentar relacionar os dous efectos principais de IL-12 estudados por nós sobre as células T (inducción da proliferación e diminución da intensidade da marcaxe de CD45RO) e trasladalos ós traballos con ADA, fixemos unha serie de experimentos nos que era posible estudar simultaneamente ambos parámetros. Pódese ver a continuación como estes experimentos resultaron moi informativos, ó darnos a posibilidade de estudar a proliferación celular e os niveis de CD45RO exactamente nas mesmas células, minimizando en parte a variabilidade debida ao doante. Os experimentos de cinética realizados déronnos unha idea, ó longo do tempo de cultivo, do efecto das interleuquinas, pero tendo en conta que se está a traballar con células,

pode que as “unidades de tempo” máis adecuadas para estudar estes fenómenos sexan as divisións celulares e non os días.

En varios dos nosos experimentos observamos a influencia do tamaño celular nalgúns dos parámetros que estabamos a estudar, así como do número de divisións sufridas pola célula. A marcaxe con CFSE permítenos detectar ata 8 rondas de división celular (Quah *et al.*, 2007) antes de que a fluorescencia do CFSE diminúa ata o nivel basal. Por outra banda, o *Forward Scatter* (FSC) dános idea do tamaño medio das células, o cal pode ser relacionado co número de divisións celulares como se verá. Na Figura 36 represéntanse as divisións celulares, expresadas como porcentaxe de leucocitos que acadan unha determinada ronda de división cando son activadas con PHA en presenza ou ausencia de IL-12.



**Figura 36. Análise das divisións celulares/tamaño celular por citometría de fluxo.** Os linfocitos foron marcados con 5  $\mu$ M CFSE e cultivados 5 días a unha densidade inicial de  $0.25 \times 10^6$  células/ml. Como estímulos da proliferación empregáronse 2.5  $\mu$ g/ml PHA (**a** e **b**) e, no seu caso (**b**) 2 ng/ml IL-12. **a)** histograma típico no que se reflexa a intensidade media de fluorescencia de CFSE nas distintas rexións establecidas segundo as diferentes xeracións celulares (0→6). **b)** porcentaxe de células que acadaron unha determinada ronda de división.

#### 4. Resultados e discusión

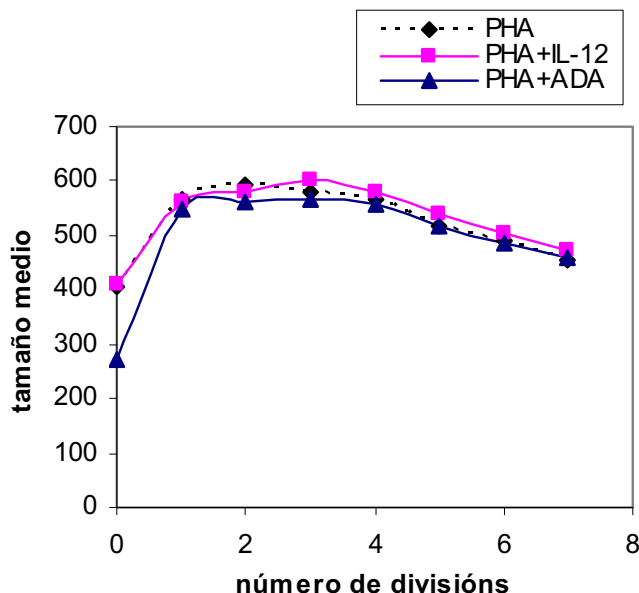
---

Como ilustra a Figura 36, existe unha alta porcentaxe de células (~25-30%) que non se dividiron ou o fixeron moi pouco. Non obstante, a maioría das células dividíronse bastantes veces ó ser activadas coa lectina, acadando un número promedio de 5 rondas de divisións (é dicir, unha división celular cada 24 horas). Observouse tamén claramente o efecto coestimulador da IL-12, que aumentou notablemente a porcentaxe de células que se dividiron máis de 5 veces. Finalmente, e aínda que non se mostra na Figura 36 para maior claridade, ADA esóxena tivo un efecto moi similar a IL-12, como era esperable.

A redución do tamaño celular acompaña a procesos celulares onde a proliferación celular é intensa, como por exemplo a maduración das células sanguíneas na médula ósea (ca excepción dos megacariocitos). O proceso de citocinese, pode non só afectar á relación núcleo-citoplasma das células, senón que no caso de proteínas cunha vida media prolongada pode levar a unha redución parella da cantidade da proteína como consecuencia do reparto do material celular entre as células fillas. CD45 é unha proteína cunha gran estabilidade e vida media larga na superficie das células (Zikherman *et al.*, 2010) polo que unha taxa proliferativa de unha división cada 24 horas podería levar a unha redución do tamaño celular das células fillas, especialmente no caso da coestimulación con IL-12 ou ADA, e consecuentemente a un menor nivel de expresión de CD45RO na superficie.

Para estudar as diferencias de volume celular total entre as células activadas con PHA e as tratadas con PHA+IL-12 ou PHA+ADA utilizamos os valores de dispersión frontal (FSC) proporcionados polo citómetro. Como se pode ver (Figura 37), efectivamente existe unha redución do volume do citoplasma das células a partir da cuarta división, pero á vista dos resultados podemos concluír que non existen diferencias significativas no tamaño das células activadas con PHA+IL-12 ou PHA+ADA se as comparamos co tamaño das que só foron estimuladas

con PHA. Ademais, unha citoquina máis mitoxénica que IL-12, como é IL-2, non era capaz de xerar reducións na IMF de CD45RO como as observadas con IL-12 ou ADA (Figura 17). Todo isto apuntaba a necesidade de buscar unha explicación alternativa para a causa da redución da IMF de CD45RO causada por IL-12 e ADA.

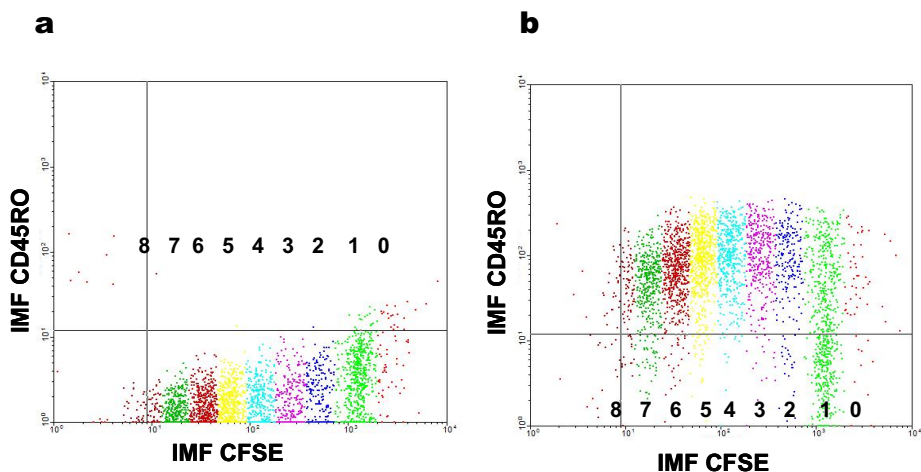


**Figura 37. Tamaño medio das células en función do número de divisións sufridas.** Tratamentos con PHA, PHA+IL-12, PHA+ADA. Os cultivos de linfocitos realizáronse nas mesmas condicións que se detallan na figura 36. No caso da curva "PHA+ADA", as células foron estimuladas con 2.5 µg/ml PHA + 1.25 U/ml ADA (preincubación de 1 hora).

Restaba nada máis que analizar nesta serie experimental o aspecto de maior relevancia, que era o nivel de expresión de CD45RO en función do número de divisións celulares levado a cabo polos leucocitos. Este tipo de estudos son escasos, e os únicos antecedentes bibliográficos que se atoparon cando se iniciaron os experimentos databan do ano 1994, cando Melkerson-Watson *et al.* describiran que o nivel de actividade fosfotirosin fosfatasa (PTPasa) de CD45 non era constante nos leucocitos, senón que sufría variacións durante o ciclo

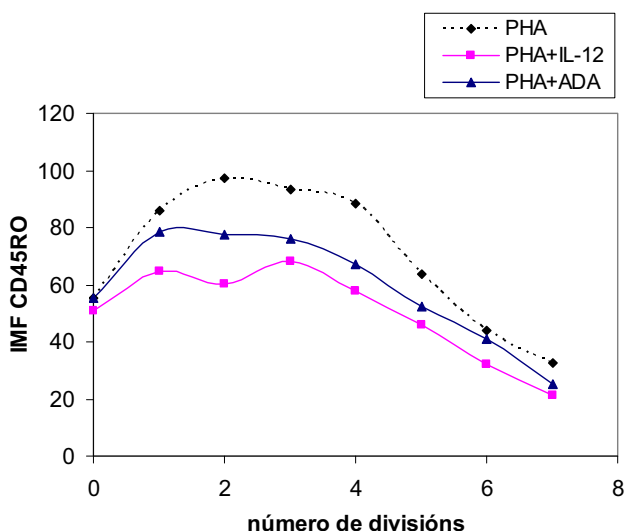
#### 4. Resultados e discusión

celular, acadando o seu nivel máximo na fase G2-M (Melkerson-Watson *et al.*, 1994). Esta variación da actividade PTPasa non dependía, según estes autores, da expresión da proteína, a cal non variaba moito, senón dun aumento da actividade enzimática específica. Deste modo, a elevación da actividade PTPasa na fase M apoiaba a hipótese de que CD45 tiña un papel relevante nos eventos de fosforilación durante o ciclo celular. Así, cando estudiamos no noso sistema experimental a expresión de CD45RO durante os distintos ciclos de división sufridos polas células, observamos unha maior cantidade da proteína na superficie dos leucocitos que atravesaran 3-5 ciclos de divisións, tal e como se observa na Figura 38, reducíndose o número de moléculas de CD45RO a partir dese punto. Máis importante, cando estudiamos como os diferentes tratamentos (ADA, IL-12) afectaban á expresión de CD45RO según transcorrían as divisións, os resultados foron claros (Figura 39).



**Figura 38. IMF de CD45RO en función dos ciclos de división celular.** No eixo x represéntase a IMF de CFSE e no y, a IMF de CD45RO. Cultivos realizados nas mesmas condicións que nas figuras anteriores. Na figura represéntanse as células tratadas con PHA. As rondas de división están representadas por cores diferentes, aparecendo máis á dereita do gráfico as células que se dividiron poucas veces (maior intensidade de CFSE) e na esquerda, as que sufriron máis divisións (menor intensidade de CFSE) **a)** Control negativo co isotipo PE. **b)** control positivo co anticorpo anti CD45RO-PE. Amósase un experimento representativo.



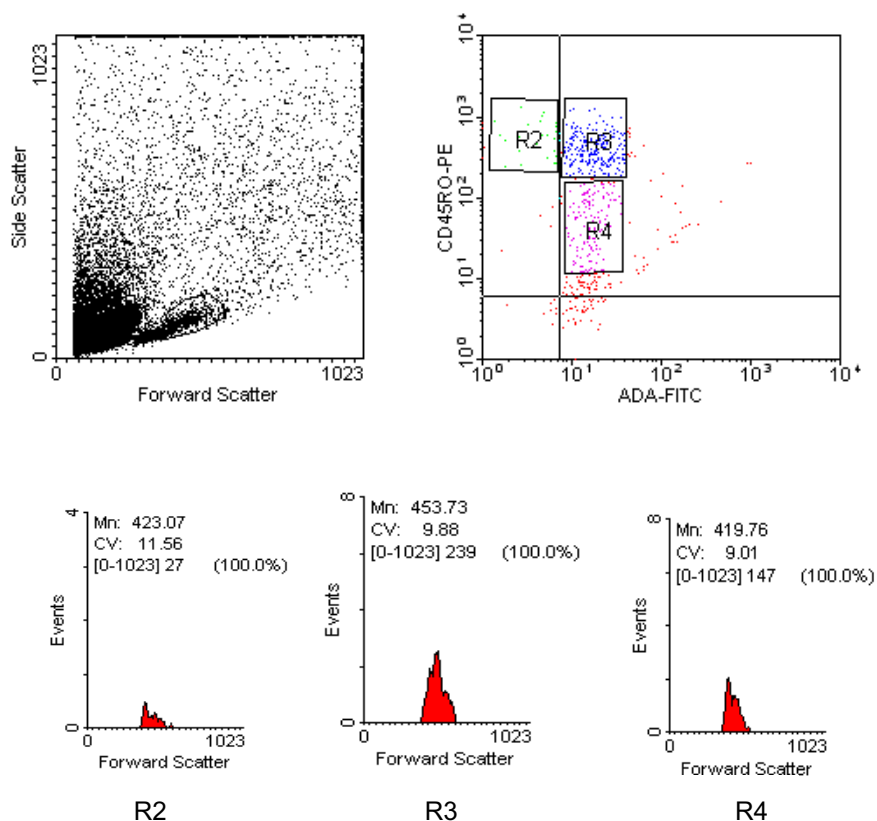


**Figura 39.** IMF de CD45 en función do número de divisións celulares e dos diferentes tratamentos (PHA, PHA+IL-12, PHA+ADA). Condicións de cultivo descritas na Figura 36.

Así, comparando co cultivo basal, no que os leucocitos foron activados con PHA, a densidade de moléculas de CD45RO viuse disminuída cando IL-12 estaba presente adicionalmente no medio de cultivo, e o mesmo ocorría, en menor medida, ó coestimular as células con ADA. Pódese observar tamén que, a partir da 3ª-4ª división é cando máis descende a intensidade media de fluorescencia de CD45RO, sen que haxa diferencias significativas nos tres tipos de cultivo. Isto pode deberse, como xa se comentou, a que a medida que as células se dividen adquiren un tamaño menor e repartirían a cantidade de CD45RO entre as células fillas, por iso detectaríamos unha menor fluorescencia de CD45RO. Isto pode apreciarse tamén na Figura 40, onde pensando nunha posible relación entre o tamaño das células e a expresión de CD45RO, mediuse o volume dos leucocitos. Nestes experimentos os PBMCs, activados 5 días con PHA, foron separados durante a análise dos datos en tres subpoboacións en función da expresión de CD45RO e máis ADA, para de seguido medir o tamaño das células en cada unha delas. Os resultados indican novamente que son as células da

#### 4. Resultados e discusión

subpoboación R4 ( $\text{ADA}^+\text{CD45RO}^{\text{low}}$ ) as de menor tamaño (medido por *Forward Scatter*). Sen embargo, e volvendo á Figura 39, chama a atención a diferencia de intensidade no sinal de CD45RO nas primeiras rondas de división celular ( $1^{\text{a}}$ - $3^{\text{a}}$ ) nos cultivos tratados con IL-12 ou ADA. Nesta etapa tan temperá, probablemente, o fenómeno non pode atribuírse a unha maior redución do tamaño celular nos cultivos tratados con IL-12 ou ADA, como consecuencia da taxa proliferativa incrementada, senón a un proceso real de regulación negativa dos niveis superficiais de CD45RO. Así, unha redución da cantidade da fosfatasa podería ser unha condición indispensable para que o mencionado incremento da proliferación dependente de IL-12 ou ADA teña lugar.



**Figura 40. Expresión de CD45RO en poboacións de linfoblastos de diferente tamaño.** Linfocitos cultivados 5 días en condicións similares ás da Figura 36.

## 6. siRNA

Un xeito de avanzar máis no coñecemento das implicacións que ten a interacción CD26-CD45RO sobre o funcionamento da fosfatasa é o silenciamento da expresión dunha desas proteínas. Optamos por silenciar o mRNA de CD26 por ser esta molécula, segundo o noso modelo e datos previos, a que podería influir sobre a expresión e localización de CD45RO na membrana plasmática.

O problema do silenciamento de CD26, ó igual que acontece co CD45, é a prolongada vida media da molécula, que no primeiro caso está preto das 50-55 horas (Fan *et al.*, 1997; Dobers *et al.*, 2000). A ese feito súmase a presenza dun *pool* de moléculas de CD26 mantido pola constante traducción do mRNA de CD26, o cal está presente en células T en repouso aínda que non se expresen moléculas de CD26 na superficie (Mattern *et al.*, 1995). Por este motivo, a expresión de CD26 na membrana plasmática permanece estable por períodos longos de tempo (96 h; Mattern *et al.*, 1991) a non ser que se utilice un anticorpo anti-CD26 para inducir a internalización da proteína en células metabolicamente activas, un proceso que require polo menos 4 h e que se acompaña dunha saída da molécula dende o citosol á superficie (Mattern *et al.*, 1995).

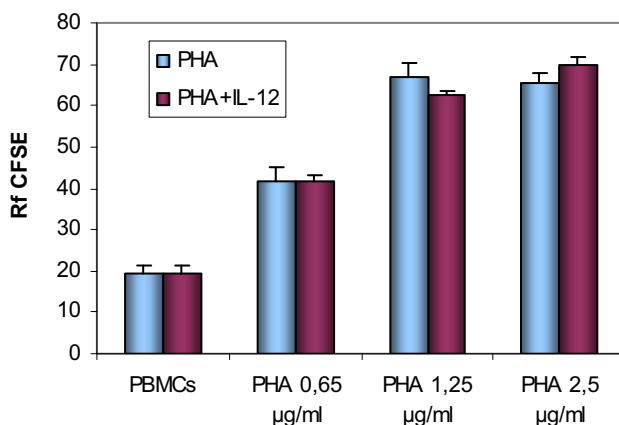
A pesar destes problemas, e como se comentou en material e métodos, o grupo de investigación xa realizara experimentos nesta liña inhibindo a traducción do mensaxeiro de CD26 mediante oligonucleótidos antisentido. Demostrouse que a redución de fluorescencia da isoforma RO nos cultivos coestimulados con IL-12 revertía ó inhibir a síntese *de novo* de CD26 mediante un oligonucleótido antisentido específico do mRNA desta proteína. Ademais, o movemento da fosfatasa fóra dos *rafts* lipídicos inducido pola citoquina durante os 5 días de duración do cultivo podía ser revertido tamén polo silenciamento xénico post-transcripcional. Restaba comprobar se o fenómeno podía observarse mellor mediante o

uso de RNAs interferentes, uns novos e en principio, máis eficaces, sistemas de silenciamento xénico post-transcripcional e, sobre todo, comprobar se existía algún efecto na taxa proliferativa dos linfocitos.

Nese contexto e con estes coñecementos previos plantexamos o novo estudo de silenciamento do mensaxeiro de CD26; fíxose necesario, polo tanto, optimizar unha vez máis as condicións de cultivo celular. O sistema celular de traballo foron de novo PBMCs humanas, cultivadas a unha densidade de 125000 células/ml, que se converteron en linfoblastos mediante o cultivo durante 5 días con PHA. Tras infructuosos e longos experimentos empregando shRNAs e sistemas retrovirais para tratar de reducir a expresión do mensaxeiro de CD26 (datos non amosados), optamos polo sistema Accell (Dharmacon) debido a súa sinxeleza e á pouca manipulación que requiren as células.

A metodoloxía Accell emprega siRNAs que se engaden a un medio de cultivo especialmente formulado para este protocolo, que é o *Accell Delivery Media* (Dharmacon). A diferenza do RPMI-1640, que era complementado cun 10% FBS nos nosos cultivos primarios de linfocitos, o *Accell Delivery Media* non contén soro, que non pode ser introducido no medio polo risco de inactivar os siRNAs. Ademais, aínda que os Accell siRNA parecían especialmente axeitados para traballar con células primarias, non existían datos previos da eficacia dos siRNA Accell con linfocitos T humanos, e moito menos con CD26. Realizamos polo tanto en primeiro lugar unha comparativa de ambos medios de cultivo en canto a proliferación celular. Utilizáronse células activadas con diferentes doses (0, 0.65, 1.25 e 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) de PHA, complementadas ou non con 2 ng/ml IL-12. Baixo estas condicións, observouse que o medio Accell provocaba unha certa inducción da proliferación das PBMCs sen estimular con respecto ó medio de cultivo completo (datos non amosados). A pesar dese feito, a lectina era capaz de inducir, de maneira dependente da dose, un aumento importante do número de células que entraban en mitose. Sen embargo, non se apreciaba claramente (entre distintos

experimentos) o efecto da IL-12 como coestimulador da mitoxénese (Figura 41).

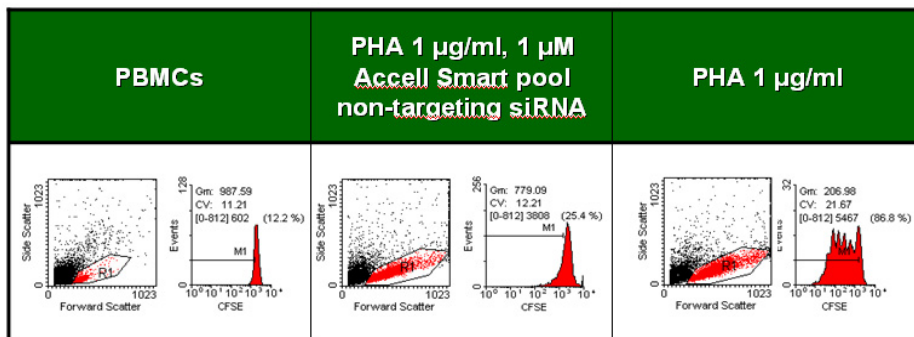


**Figura 41. Efecto da dose de PHA sobre a proliferación celular en medio Accell.** PBMCs cultivados 5 días en medio Accell coas doses indicadas de PHA e en presenza/ausencia de IL-12 (2 ng/ml). En abscisas, porcentaxe de células que se dividiron alomenos unha vez. Datos media de 3 experimentos feitos con triplicados  $\pm$ SD.

Como se aprecia na Figura 41, é arredor de 1.25  $\mu$ g/ml de PHA a cantidade coa que se acada unha proliferación celular óptima en cultivos co medio Accell, xa que así se obtén unha taxa proliferativa que case dobra a obtida coa concentración de 0.65  $\mu$ g/ml. Con 2.5  $\mu$ g/ml a proliferación observada tamén era un pouco máis elevada, pero podería supoñer un estímulo excesivo para as células que lles impedira responder a outros tratamentos. Ademais, plantexámonos se o medio Accell utilizado para todos os experimentos de interferencia podería conter algún tipo de activador da proliferación na súa composición que puidese enmascarar o efecto da IL-12. Ó ser un medio comercial, a súa composición é descoñecida.

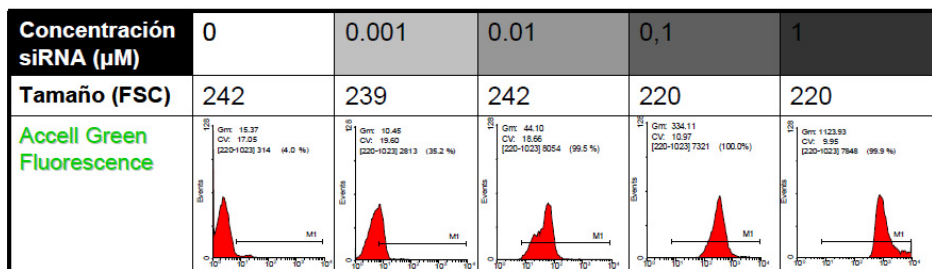
#### 4. Resultados e discusión

Outro problema distinto xurdiu cando os siRNA foron engadidos ó medio Accell. Observouse que a concentración de traballo especificada pola casa comercial (1  $\mu$ M) provocaba unha mortalidade moi alta nas células T activadas (Figura 42). Como consecuencia, fíxose necesario disminuír a cantidade de siRNA que sería engadida ó cultivo coa fin de obter unha viabilidade máis aceptable (Figura 43).



**Figura 42. Efecto da concentración de siRNA especificada por Dharmacon sobre a viabilidade celular.** Amósanse os histogramas nos que se mediu a Rf e IMF de CFSE comparando 3 condicións: PBMCs, blastos cultivados con 1  $\mu$ g/ml PHA e 1  $\mu$ M de Accell Smart pool non-targeting siRNA (ou siRNA CD26, obtendo os mesmos resultados) e blastos cultivados só con 1  $\mu$ g/ml PHA. A redución do tamaño celular e do número de divisións celulares é evidente.

Para estimar a cantidade de siRNA que se debía utilizar fíxose un ensaio con diferentes concentracións de siRNA, empregando unha molécula de siRNA marcada cun fluorocromo (*Accell green non targeting siRNA*) para medir a cantidade do siRNA incorporada polas células. Considerando este parámetro así como o tamaño e a viabilidade celular (Figuras 42 e 43), elixiuse unha concentración de 0.02  $\mu$ M, un pouco superior á concentración 0.01  $\mu$ M empregada na Figura 43, que implica >98% de incorporación do siRNA no interior das células e unha elevada viabilidade celular.



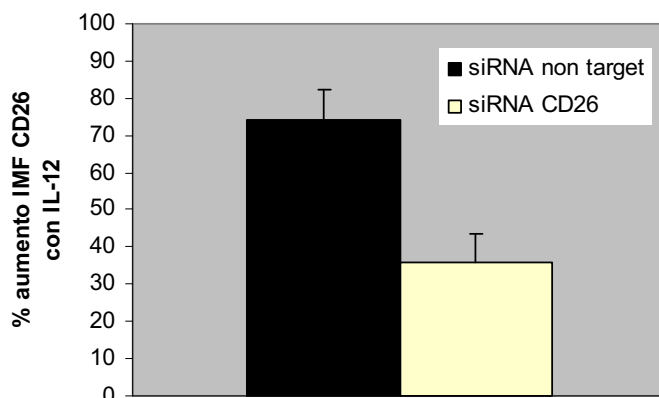
**Figura 43. Efecto da concentración de siRNA sobre o tamaño celular e a incorporación do interferente polos blastos.** En condicións de cultivo similares a experimentos anteriores engadíronse as concentracións indicadas de siRNA e mediuse tanto o tamaño celular (FSC, que dá idea dos efectos citotóxicos do exceso de siRNA) como a IMF do marcador *Accell green*, que indica a cantidade de siRNA captada polas células.

Unha vez optimizadas as condicións de cultivo celular, comprobamos a efectividade dos siRNAs medindo a expresión de CD26 e estudando as poboacións segundo os seus tamaños. Novamente observamos que, ó ser CD26 un marcador de activación, a súa expresión era máis elevada canto maior era o tamaño das células. IL-12 potenciaba o efecto da lectina PHA, elevando aínda máis os niveis de CD26 tanto nos cultivos en ausencia como, curiosamente, en presenza do siRNA *non-targeting* (datos non amosados), diferenza que se probablemente se deba á supervivencia celular causada pola IL-12 que contrarresta o lixeiro efecto citotóxico provocado polo siRNA.

Máis importante, comprobamos ademais a eficacia do siRNA específico de CD26, que diminuíu a expresión desta molécula arredor dun 50% de media. Este feito era apreciable, sobre todo, nas células máis grandes, e especialmente nos cultivos coestimulados con IL-12 (Figura 44). Esta redución do efecto que IL-12 ten sobre os niveis de CD26 pode explicarse tendo en conta que o siRNA provoca a destrución do mRNA, necesario para manter o *pool* intracelular desta molécula mediante un proceso de tradución continuo de moléculas da peptidasa (Mattern *et al.*, 1995). Sábese que a presenza de cicloheximida no medio

#### 4. Resultados e discusión

de cultivo, un inhibidor da actividade peptidil transferasa dos ribosomas eucariotas, bloquea o efecto potenciador de IL-12 sobre a expresión de CD26 (Salgado *et al.*, 2000), polo que esta citoquina actúa a nivel traduccional provocando o aumento de CD26 na superficie. En cambio, a influencia da lectina sobre os niveis de CD26 ten que ver máis coa externalización vía Golgi da proteína, e non tanto coa tradución do mensaxeiro (Cordero *et al.*, 2001a), o que explica que nos blastos coestimulados con IL-12 se observe máis claramente a destrución do mensaxeiro de CD26 polo siRNA.

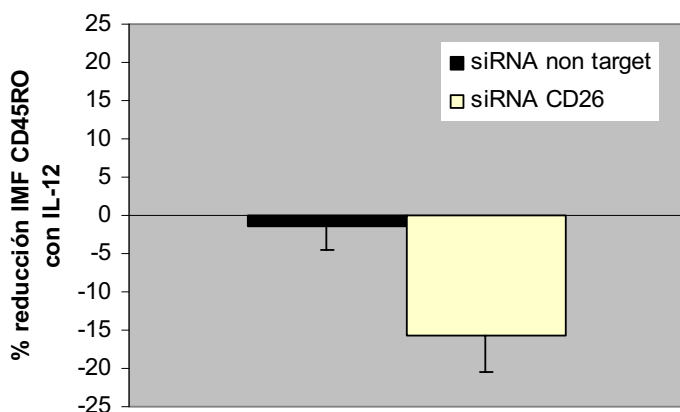


**Figura 44. Redución da síntese *de novo* de CD26 en blastos tratados con Accell siRNA CD26.** Blastos cultivados 6 días en medio Accell con 1 µg/ml de PHA, en ausencia ou presenza de 2 ng/ml IL-12. Os datos presentados correspóndense á porcentaxe de incremento da intensidade media de fluorescencia de CD26 nos blastos coestimulados con IL-12 con respecto o basal (células activadas só con PHA). As células foron tratadas con 0.02 µM siRNA *non target* ou coa mesma concentración do siRNA específico do mRNA de CD26 (siRNA CD26). Os datos proceden da media  $\pm$  SEM de tres experimentos independentes ( $n=3$ ), cada un deles feito a súa vez por triplicado.

En relación a como afecta o silenciamento do mRNA de CD26 á expresión de CD45RO, unha vez máis observamos o efecto que IL-12 provocaba sobre esta molécula, reducindo a intensidade media de fluorescencia de CD45RO nos cultivos en presenza (Figura 45) ou ausencia (datos non amosados) do siRNA inespecífico (*non-target*). Sen

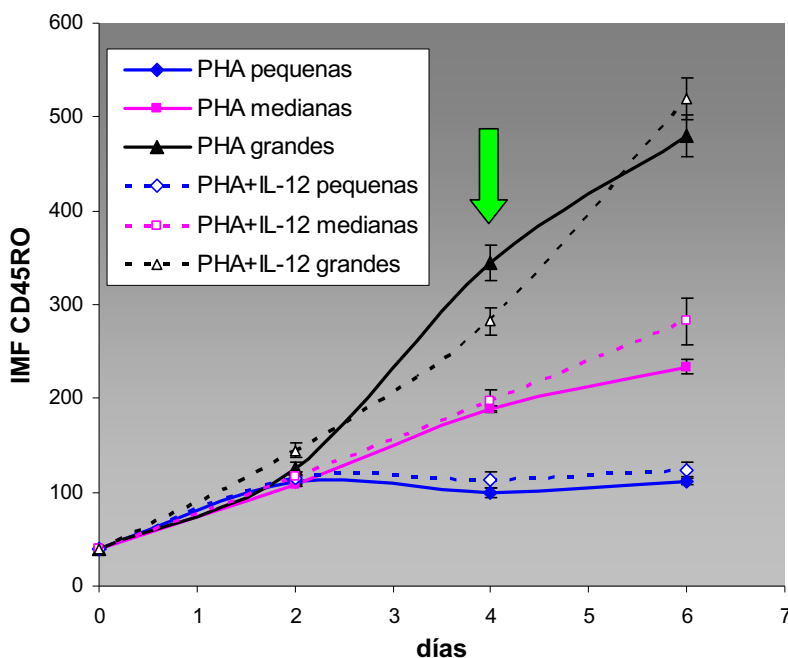


embargo, ó engadir o siRNA CD26, esta diferenza na IMF de CD45RO entre os cultivos coestimulados ou non con IL-12 anulábase case totalmente, poñendo de manifesto unha vez máis a importante relación entre CD26 e CD45RO. Polo tanto, a redución da síntese *de novo* de CD26 mediante interferencia ten un efecto evidente na densidade de moléculas de CD45RO na superficie celular, unha modulación negativa que podería relacionarse cunha maior proliferación celular.



**Figura 45. Reducción da IMF de CD45RO en blastos coestimulados con IL-12 e tratados con Accell siRNA CD26.** Blastos cultivados en medio Accell e activados durante 6 días con 1 µg/ml de PHA, en ausencia ou presenza de 2 ng/ml IL-12. Os datos describen a porcentaxe de redución da IMF de CD45RO nos blastos coestimulados con IL-12 cando é comparada ca IMF de CD45RO nas células activadas só con PHA (Basal). As células foron tratadas con 0.02 µM dos siRNAs (siRNA *non target* ou siRNA CD26). Os datos proceden da media ± SEM de tres experimentos independentes, cada un deles feito por triplicado.

Á vista destes datos e coa intención de facer un seguimento máis en detalle dos efectos da estimulación con PHA e IL-12 en medio Accell, realizouse un estudo cinético da expresión de CD45RO en cultivos de células tratadas con 1,25 µg/ml PHA ou con 1,25 µg/ml PHA + 2 ng/ml IL-12, nas mesmas condicións que aparecen na Figura 34 do apartado 5.1 Os resultados deste experimento aparecen na Figura 46.

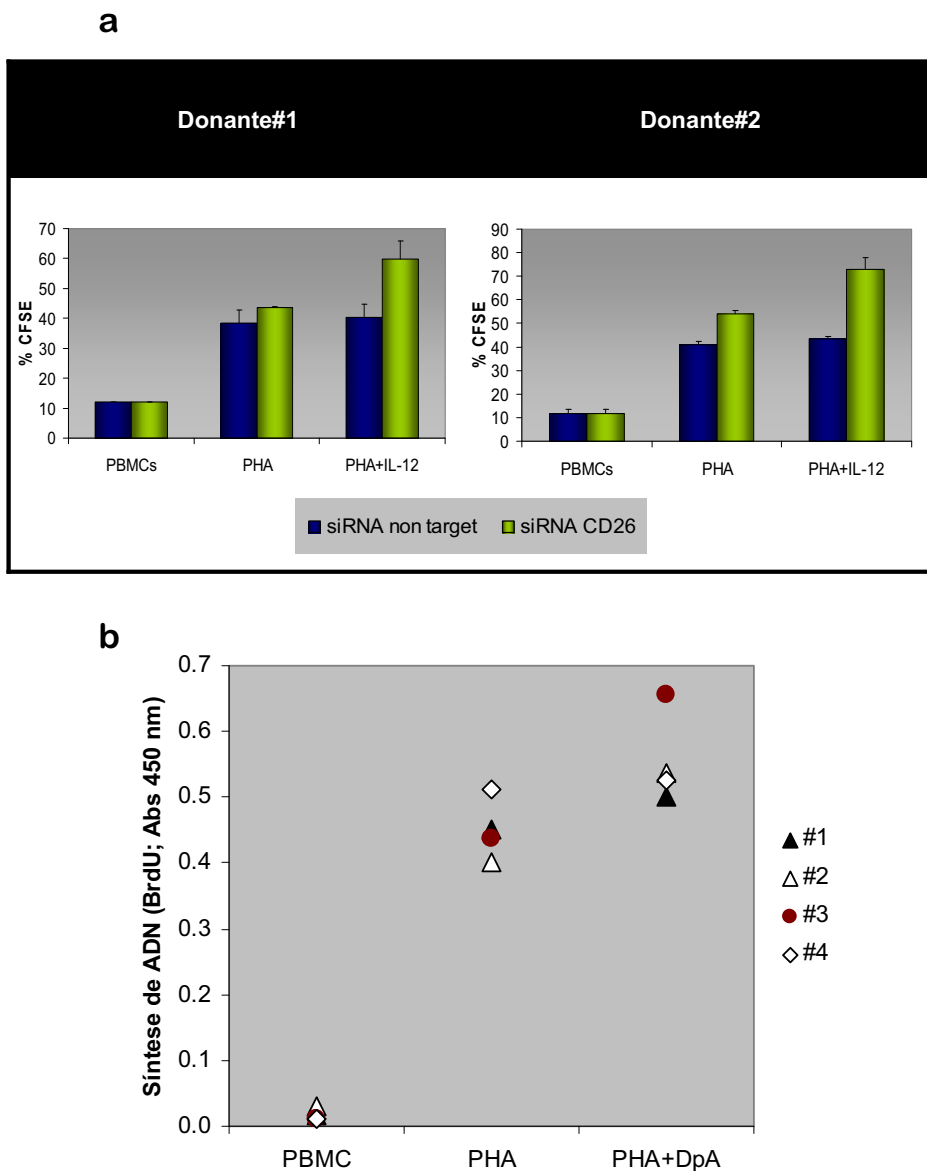


**Figura 46. Cinética da expresión de CD45RO en medio Accell.** PBMCs estimuladas con 1.25 µg/ml PHA en ausencia/presencia de 2 ng/ml IL-12, cultivadas 6 días en medio Accell. Cada 48 h recolléronse alicuotas de cada condición que foron lavadas e fixadas con PFA 1% en PBS, conservándose a 4°C ata a marcaxe con anti-CD45RO-PE UCHL-1. Os datos son media de triplicados ±SD.

É habitual que os medios de cultivo inclúan activadores da proliferación na súa composición, que como xa se comentou, puideran enmascarar o efecto da IL-12. Observando a Figura 46, apréciase que nos primeiros días do cultivo a expresión de CD45RO é bastante baixa e non somos capaces de apreciar o efecto da IL-12, algo esperable xa que sabemos que a expresión máxima da cadea β2 do receptor da IL-12 se produce a partir do día 2 logo da activación con PHA. Vemos a partir dese momento que a expresión de CD45RO aparece reducida por efecto da IL-12 (tal como ocorría nos cultivos con medio RPMI completo, Figura 34), sendo máximo o efecto no día 4 de cultivo e nos blastos de maior tamaño (flecha verde) nos que se observa a maior diferenza entre as células tratadas con PHA e as tratadas con PHA+IL-12. Nos cultivos en medio completo, o máximo efecto da IL-12 sobre a expresión de

CD45RO ocorría no día 5 de cultivo. Os blastos da Figura 46 estiveron en cultivo durante 6 días, o que pode causar que a diminución da expresión de CD45RO dependente de IL-12 non sexa observable nese momento, e si no día 4.

Por tal motivo, observouse se o siRNA específico do mensaxeiro de CD26 tiña un efecto claro sobre a mitoxénese das células. Como se aprecia na Figura 47a, o siRNA CD26 tende a potenciar o efecto proliferativo que xa de por si tiña a fitohemaglutinina, pero moi especialmente o relacionado coa coestimulación con IL-12. Podíamos concluir, polo tanto, que os baixos niveis de CD45RO, potenciados pola presenza do siRNA de CD26 no medio de cultivo, estaban a favorecer a proliferación celular. Máis aínda, cando se mediu a síntese de DNA mediante a incorporación de BrdU nos cultivos de PBMCs en estado basal ou ben activados (PHA), comprobouse que a presenza de diprotina A (DpA; Ile-Pro-Ile), un inhibidor competitivo da actividade DPPIV, tamén potenciaba a proliferación celular nas nosas condicións experimentais. Todo isto apuntaba a posibilidade de que CD26, máis que unha simple molécula coestimuladora da activación do linfocito T, pode ser tamén unha molécula inhibidora, alomenos nalgúns circunstancias e momentos do ciclo vital do linfocito T. De feito, aínda que a maior parte dos traballos sinalan a CD26 como unha proteína coestimuladora (Pacheco *et al.*, 2005; Ohnuma *et al.*, 2008), esta tamén foi xa sinalada como unha posible molécula inhibidora por algúns investigadores (Abe *et al.*, 2005; Preller *et al.*, 2007).



**Figura 47. Efecto de siRNA sobre a proliferación celular. a)** Células cultivadas 6 días en placas de 96 pocillos, 1.25  $\mu\text{g/ml}$  PHA e en presenza/ausencia de 2 ng/ml IL-12. O cultivo contén, según se indique, 0.02  $\mu\text{M}$  de Accell siRNA *non-target* ou de Accell siRNA-antiCD26. Os datos corresponden a dous doantes e son representativos de varios cos mesmos resultados, representan a porcentaxe de células que se dividiron polo menos unha vez, e son media de 3 réplicas  $\pm$ SD. **b)** Síntese de DNA, medida mediante incorporación de BrdU (derradeiras 18 h de cultivo), nos PBMCs procedentes de 4 doantes sanos incubados en medio completo durante 4 días en ausencia (PBMCs) ou presenza de PHA (2  $\mu\text{g/ml}$ )  $\pm$ Diprotina A (DpA; 12.5  $\mu\text{M}$ ).

Podemos concluír, polo tanto, que os baixos niveis de CD45RO, potenciados pola presenza do siRNA de CD26 no medio de cultivo, estaban a favorecer a proliferación celular. Na táboa 2 recóllense os efectos que o siRNA anti-CD26 provoca na proliferación celular así como na expresión de CD26 e CD45RO.

Efectos siRNA CD26			
	Proliferación	Expresión CD26	Expresión CD45RO
Expto#1	++	--	--
Expto#2	+++	---	Sen efecto
Expto#3	+++	--	-
Expto#4	+++	---	---
Expto#5	+++	Sen efecto	---

**Táboa 2. Resumo de efectos de siRNA anti CD26 sobre a proliferación celular e a expresión de CD26 e CD45RO.** Efectos causados pola adición de siRNA antiCD26 a cultivos de PBMCs durante 5 días activados con 1.25µg/ml PHA coestimulados ou non con 2 ng/ml IL-12. Representáanse 5 experimentos nos que se mediu o grao de proliferación (IMF CFSE) e a expresión de CD26 e CD45RO mediante citometría de fluxo.

### 7. nTregs

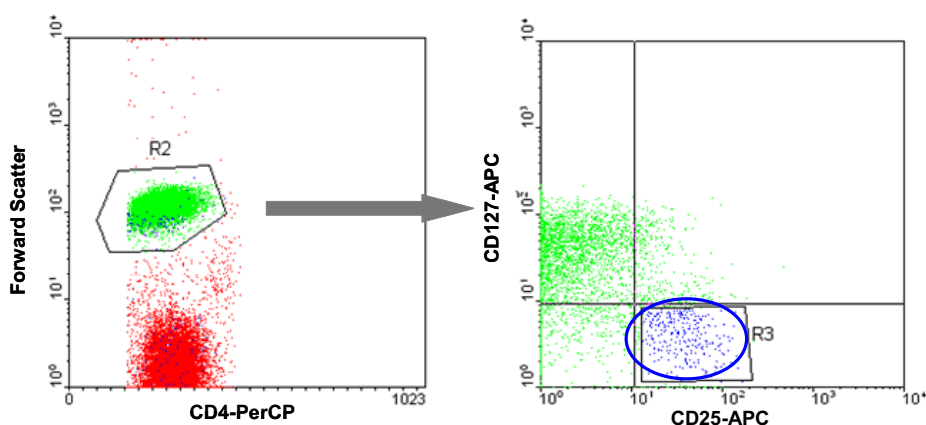
As células T reguladoras naturais (nTregs) xogan un papel indispensable no mantemento da falta de resposta ós propios antíxenos e na supresión de respostas inmunes excesivas nocivas para o hóspede. As células nTregs prodúcense no timo como unha subpoboación de células T funcionalmente maduras podendo tamén ser inducidas na periferia (iTregs) a partir de células T naïve presentando un fenotipo característico  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ . Representan en humanos arredor dun 5% do total de células T  $CD4^+$  e recentes investigacións revelan as bases celulares e moleculares do desenvolvemento e función das Tregs e implican a desregulación das Tregs nas enfermidades inmunolóxicas (Oh *et al.*, 2010; Venken *et al.*, 2010; von Boehmer & Melchers, 2010).

Como se mencionou anteriormente, altas doses de PHA ou ben a coestimulación con IL-12 ou ADA esóxenas reducen de forma manifesta a expresión de CD45RO na superficie de linfocitos humanos, e esta menor expresión correspóndese tamén cunha maior taxa proliferativa. Neste sentido, comprobamos que a expresión de CD45RO reducíase a medida que as rondas de división se sucedían nas células. Á vista destes resultados, e considerando que as células T reguladoras mostran unha certa resistencia á activación/proliferación (anexia) en experimentos *in vitro*, consideramos interesante analizar nestas células a presenza de CD45RO e CD26.

Este estudo foi deseñado de tal xeito que en primeiro lugar se caracterizaron fenotipicamente as nTregs en PBMCs mediante o uso dos marcadores CD4, CD25, CD127 e FoxP3, para que, unha vez tiveramos delimitada a poboación, analizar nestas células a expresión de CD26 e CD45RO. Nunha segunda etapa comparamos os niveis extracelulares destes marcadores (CD4, CD25, CD127, FoxP3) nas poboacións reguladoras naturais de PBMCs ou blastos activados con PHA, para a

continuación analizar comparativamente a presenza de CD45RO e CD26.

Con esta fin, empezouse por facer unha caracterización fenotípica das nTregs analizando os marcadores clásicos CD4 e CD25, así como os máis recentes FoxP3 e CD127 (revisado en Sakaguchi, 2005). Este último, que se corresponde coa cadea  $\alpha$  do receptor da IL-7 (IL-7R $\alpha$ ) permite discriminar entre células CD127<sup>-</sup>, que serían as nTregs, e células CD127<sup>high</sup>, ou linfocitos Th sen fenotipo regulador (Liu *et al.*, 2006). En función destes criterios realizouse unha primeira selección das células CD4<sup>+</sup> e a continuación foron delimitados os linfocitos que cumpría o criterio de ser CD25<sup>high</sup> e CD127<sup>-</sup>. Esta poboación CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup> que se corresponde coas nTregs aparece na Figura 48 sinalada cun círculo azul (poboación R3).

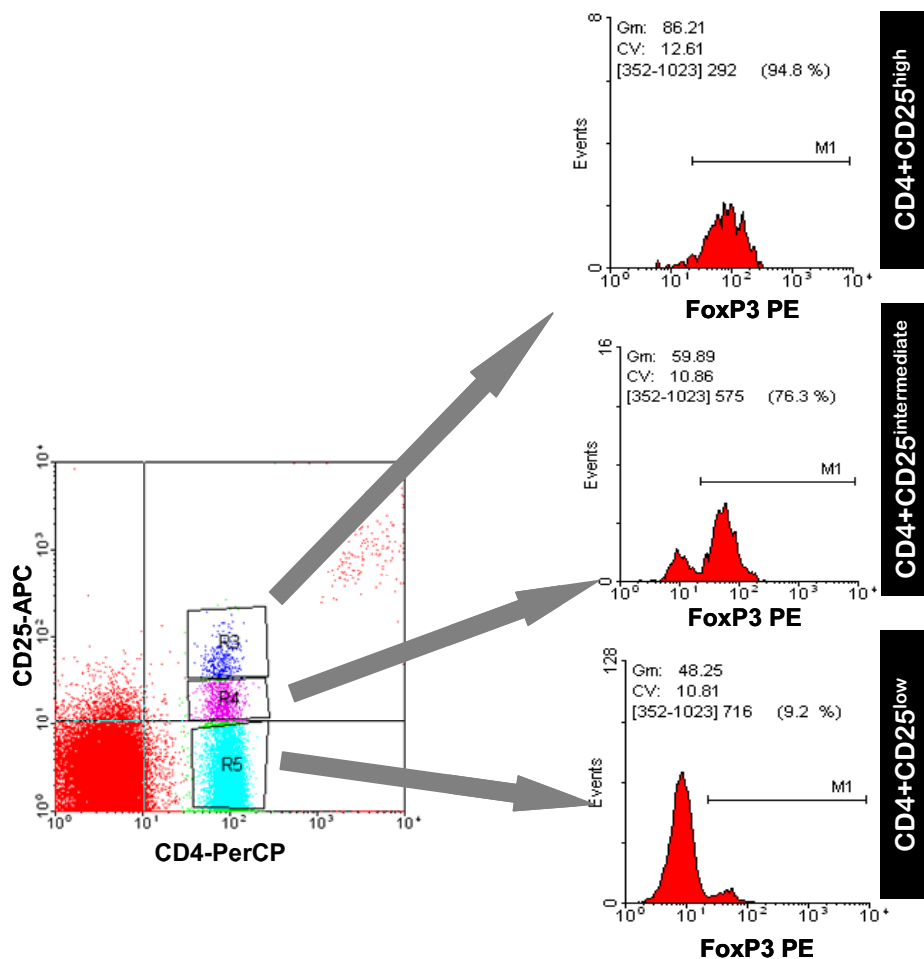


**Figura 48. Caracterización fenotípica de nTregs mediante marcadores clásicos (CD4, CD25, CD127).** PBMCs extraídas de *buffy coat* e marcadas cos anticorpos que se indican na figura

Para completar a caracterización das nTregs na poboación CD4<sup>+</sup>, discriminamos entre varios niveis de expresión de CD25, e analizamos neles a presenza de FoxP3, o factor de transcripción que as define (Hori *et al.*, 2003; Khattry *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003). Como se pode apreciar na Figura 49, as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (nTregs, R3) son

#### 4. Resultados e discusión

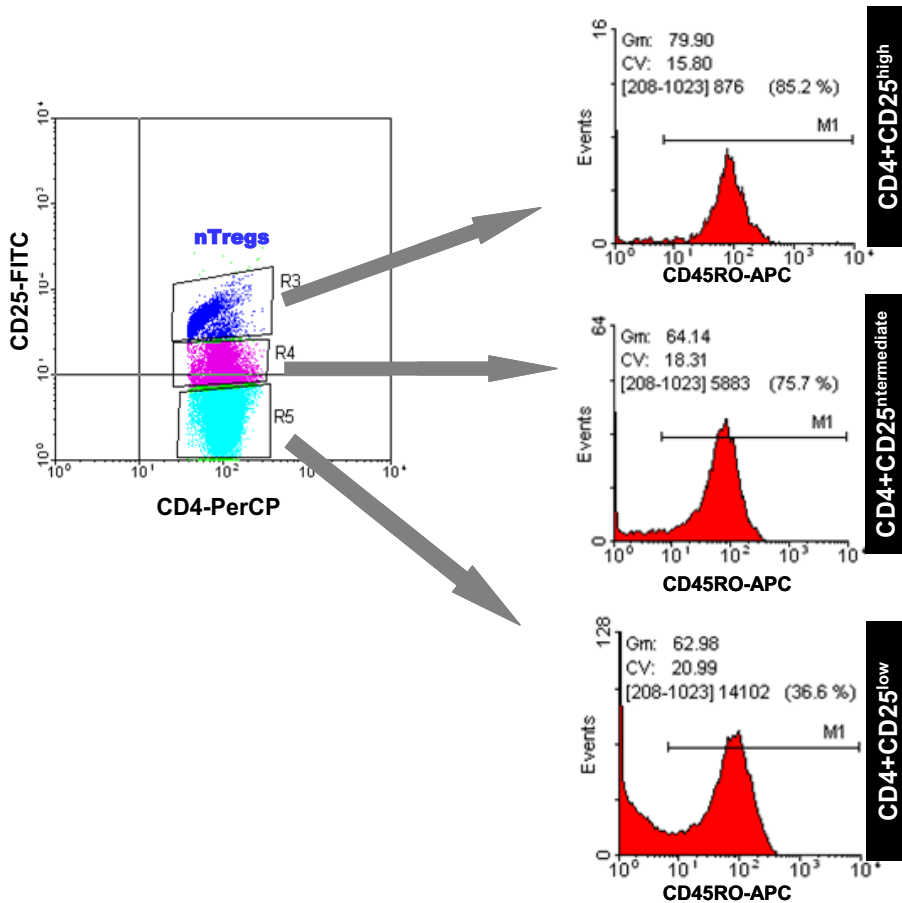
FoxP3<sup>high</sup>, xa que case un 95% das células expresaba o marcador. A expresión de FoxP3 diminuía na rexión CD4<sup>+</sup>CD25<sup>intermediate</sup>, e aínda máis no caso das CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>, cuxa porcentaxe de células FoxP3<sup>+</sup> se reducía drasticamente ata acadar un 9-10%; confirmando a correlación directa que parece existir entre a expresión de CD25 e FoxP3 xa descrita por outros investigadores (Fontenot & Rudensky, 2005). Podemos dicir que con este conxunto de marcadores temos perfectamente identificada a poboación de células T reguladoras.



**Figura 49. Caracterización fenotípica de nTregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> mediante o factor de transcripción FoxP3.** PBMCs extraídas de *buffy coat* e marcadas cos anticorpos que se indican na figura.



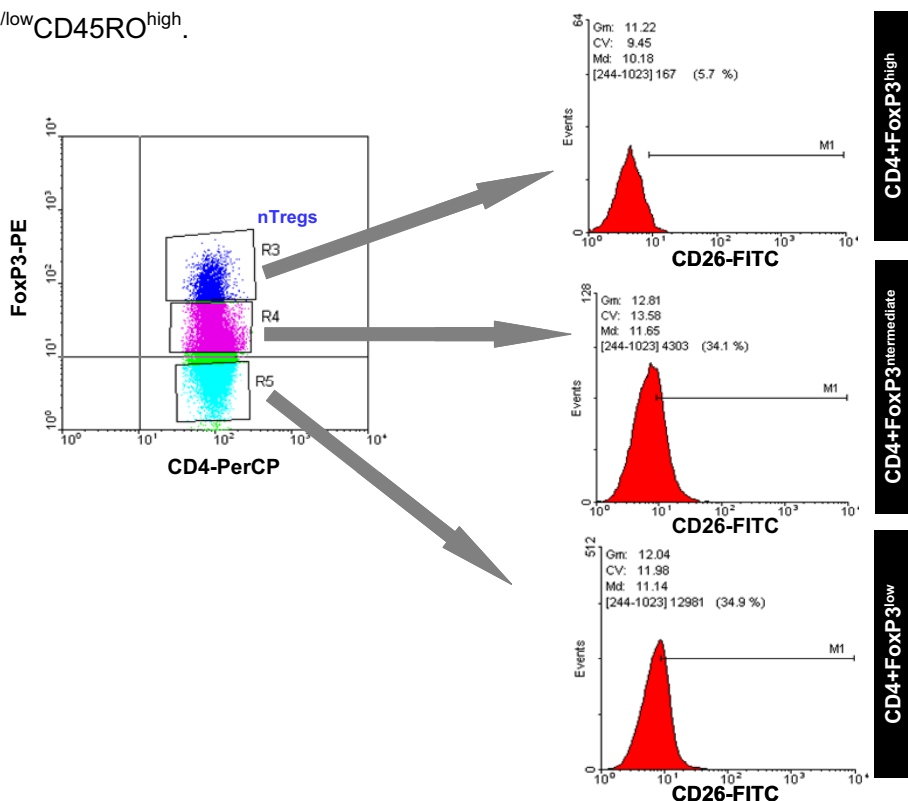
Unha vez establecida en PBMCs a poboación  $CD4^+CD25^+ FoxP3^+$ , pasamos a analizar a expresión de CD45RO e CD26 nas células nTregs. Según se observa na Figura 50, a expresión de CD45RO é alta (arredor dun 85%) nas nTregs (R3), dato que concorda cos resultados de Baecher-Allan *et al.*, 2001. Unha vez máis ponse de manifesto a relación existente entre elevados niveis de expresión de CD45RO e unha baixa taxa de proliferación. As células efectoras (R4 e R5) presentan unha menor expresión desta fosfatasa, e trátase de células capaces de proliferar activamente.



**Figura 50. Expresión de CD45RO en nTregs e células efectoras.** PBMCs extraídos de *buffy coats* e marcados con anti CD4-PerCP, anti CD25-FITC, anti FoxP3-PE e anti CD45RO-APC. Na rexión  $CD4^+$  distínguense 3 poboacións en función dos niveis de CD25: as  $CD4^+CD25^{high}$  son as nTregs (R3), e as de niveis intermedios ou baixos de expresión deste marcador (R4 e R5) son células efectoras.

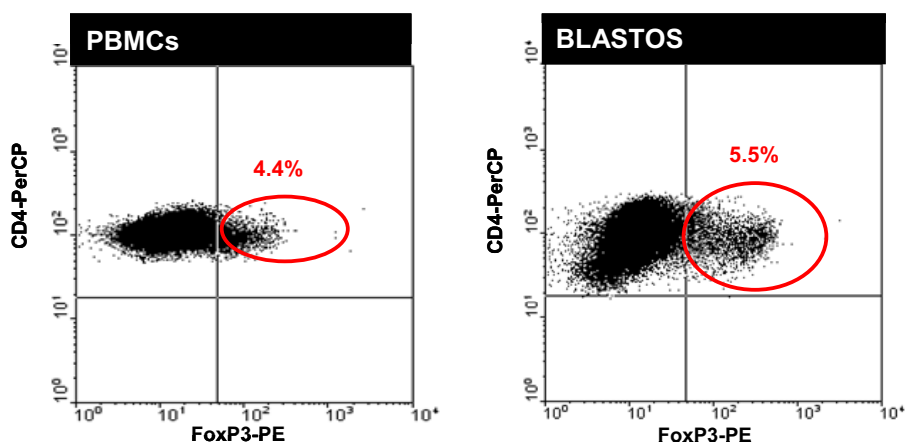
#### 4. Resultados e discusión

En canto ós resultados obtidos para CD26, na Figura 51 obsérvase claramente a baixa expresión de CD26 (arredor dun 6%) nas nTregs (R3,  $CD4^+FoxP3^{high}$ ). Este fenotipo  $CD26^{low}$  foi comprobado mediante a utilización de diferentes clons de anticorpo anti-CD26 (TP1/16, TP1/19 e L272) (datos non amosados) e concorda co atopado por Ma *et al.*, 2008 en casos de linfoma Hodgkin clásico. Moi recentemente publicouse un traballo que demostraba a baixa expresión de CD26 nas nTreg humanas (Mandapathil *et al.*, 2010) Sen embargo, nas rexións con menor expresión de FoxP3 (R4 e R5), especialmente nas células efectoras  $CD4^+FoxP3^-$  (R5), aprécianse xa uns niveis intermedios de CD26, arredor dun 35%, como se observan nos histogramas correspondentes da Figura 51. Do conxunto de resultados amosados nas Figuras 50 e 51 podemos concluír así que as células nTregs  $CD4^+CD25^+FoxP3^{high}$  son  $CD26^{low}/CD45RO^{high}$ .



**Figura 51. Expresión de CD26 en nTregs.** PBMCs extraídos de *buffy coats* e marcados cos anticorpos que aparecen na figura. Distínguense tres rexións  $CD4^+$  en función da expresión de FoxP3 e mediuse en cada unha delas a expresión de CD26.

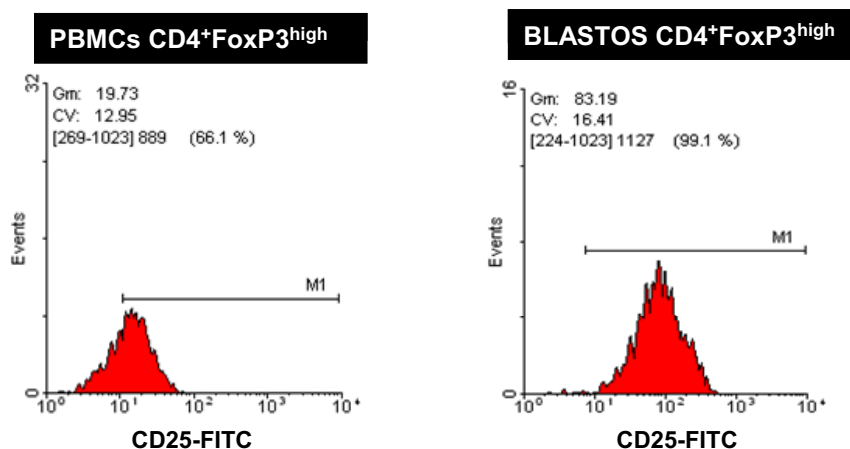
Dado que CD26 e CD45RO ven afectada a súa expresión pola activación celular, e para correlacionar a expresión de CD26 e CD45RO en nTregs cos nosos estudos en linfocitos T activados co mitóxeno PHA, aplicamos unhas condicións de cultivo similares ás dos experimentos anteriores (5 días de cultivo, activación con 1 µg/ml PHA). Transcurrido ese tempo, fenotipamos de novo a poboación de nTregs empregando os mesmos marcadores. O primeiro que se observou, tal como se ve na Figura 52, foi que nas células cultivadas en presenza de PHA tanto a expresión de CD4 como de FoxP3 víanse afectadas, e que por ese motivo, a porcentaxe de células con fenotipo regulador (arredor dun 4.5% das CD4<sup>+</sup>) incrementábase lixeiramente. Sábese que a expresión de FoxP3 está aumentada por causa da estimulación vía TCR (Ziegler, 2007), que non é suficiente para inducir a expresión de FoxP3 en células T humanas, senón que depende do TGF-β producido polas propias células T activadas (Hori, 2008). Deste modo, unha porcentaxe significativa de células T CD4<sup>+</sup> efectoras (e incluso CD8<sup>+</sup>) comezará a expresar FoxP3 ó ser activadas, volvéndose así indistinguibles fenotipicamente das nTregs (Walker *et al.*, 2003). Sen embargo, só as células capaces de manter elevados os niveis de FoxP3 (FoxP3<sup>high</sup>) terán capacidade supresora.



**Figura 52. Porcentaxe de nTregs en PBMCs e blastos.** PBMCs extraídos de *buffy coats* e marcados cos anticorpos que aparecen na figura. Blastos da mesma procedencia, cultivados 5 días en presenza de 1 µg/ml de PHA.

#### 4. Resultados e discusión

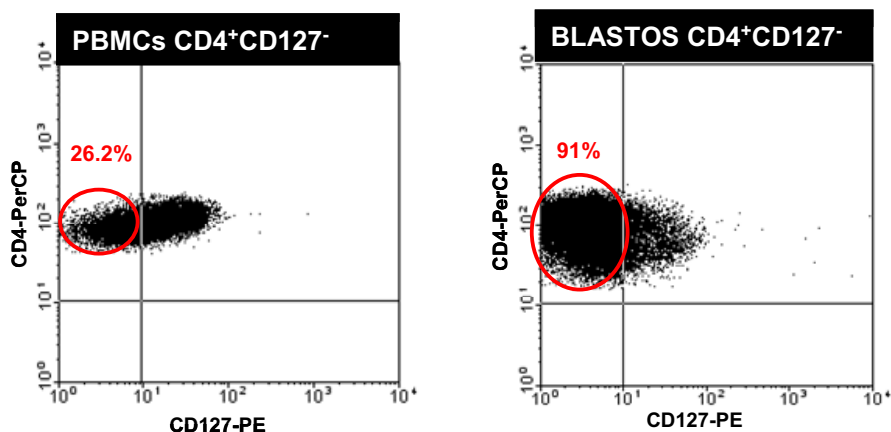
Utilizando a mesma rexión  $CD4^+FoxP3^{high}$  medimos a expresión de CD25 antes e despois da activación celular. A expresión deste marcador aumenta da orde dun 30% por mor da activación (Figura 53). Este dato confirma o observado por Allan *et al.*, 2007 e é explicable porque se expresa constitutivamente en nTregs (sería arredor dun 60%, a porcentaxe observada en PBMCs), pero a súa expresión é inducible en células activadas, sexan ou non Tregs (Yamakazi *et al.*, 2003; Allan *et al.*, 2007).



**Figura 53. Expresión de CD25 en nTregs (PBMCs e blastos).** PBMCs extraídos de *buffy coats* e marcados con anti CD4-PerCP, anti FoxP3-PE e CD25-FITC. Blastos da mesma procedencia, cultivados 5 días en presenza de 1  $\mu$ g/ml de PHA. Os datos do histograma correspóndense coas células comprendidas na rexión  $CD4^+ FoxP3^{high}$  similar á da Figura 51.

Outro marcador analizado foi CD127. Os resultados dos estudos con PBMCs (Figura 48) mostraban que a baixa abundancia desta molécula podería axudar a discriminar a poboación de nTregs das células T efectoras. Na Figura 54 observamos como a activación con PHA provocaba un forte aumento da poboación  $CD127^-$  (~65%). Este feito concordaba con estudos recentes que amosaban que CD127 non era un marcador de células reguladoras tan axeitado como se pensaba, xa que ó ser activadas, as células T efectoras adquirían un fenotipo  $CD127^-$  característico de linfocitos T supresores (Allan *et al.*, 2007; Aerts

*et al.*, 2008). Ademais, a perda de CD127 tamén é típica das células Th foliculares, que colaboran coas células B (Lim & Kim, 2007).



**Figura 54. Expresión de CD127 en nTregs antes e depois da activación con PHA.** PBMCs extraídos de *buffy coat* e marcados cos anticorpos que aparecen na figura. Blastos procedentes do mesmo *buffy coat* e cultivados 5 días en presenza de 1 µg/ml PHA. Representase a porcentaxe de células CD4<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> para ambas condicións.

Unha vez rematada a caracterización fenotípica das nTregs no referido ós marcadores máis clásicos (CD4, CD25, FoxP3 e CD127), tanto en PBMCs como en blastos, pasamos a realizar un estudo da influencia da activación celular sobre os niveis de CD26 e CD45RO das nTreg. No que respecta a CD26 (Figura 55), a súa expresión en células T reguladoras naturais aumenta un pouco nas células activadas, aínda que segue sendo baixa (arredor dun 20%); o que contrasta cos altos niveis de expresión que atopamos en linfocitos T efectores activados (aproximadamente un 50%; Figura 52). Comprobamos tamén que os baixos niveis extracelulares de CD26 nas nTregs se corresponden cun “pool” intracelular de moléculas de CD26 moi reducido (datos non amosados); descoñecemos actualmente se existen menores niveis de mRNA tamén nestas células. Resulta paradóxico, por outro lado, que as nTregs, que posúen un fenotipo de linfocitos T activados ó expresar CD25, HLA-DR ou CD45RO por exemplo (Borsellino *et al.*, 2007;

#### 4. Resultados e discusión

Baecher-Allan *et al.*, 2001), presenten baixos niveis de CD26, considerado tamén un marcador de activación clásico. Esta reducida densidade da peptidasa nas nTregs, por outra banda, podería estar relacionada coas baixas taxas de proliferación destas células *in vitro*, xa que causaría unha diminución da produción de IL-2 e de citocinas como IFN- $\gamma$ , ó mesmo tempo que o aumento de outras como o TGF- $\beta$ , que causaría os efectos inmunosupresores autocrinos e paracrinos atribuídos a esta subpoboación de células T (Horwitz *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008).

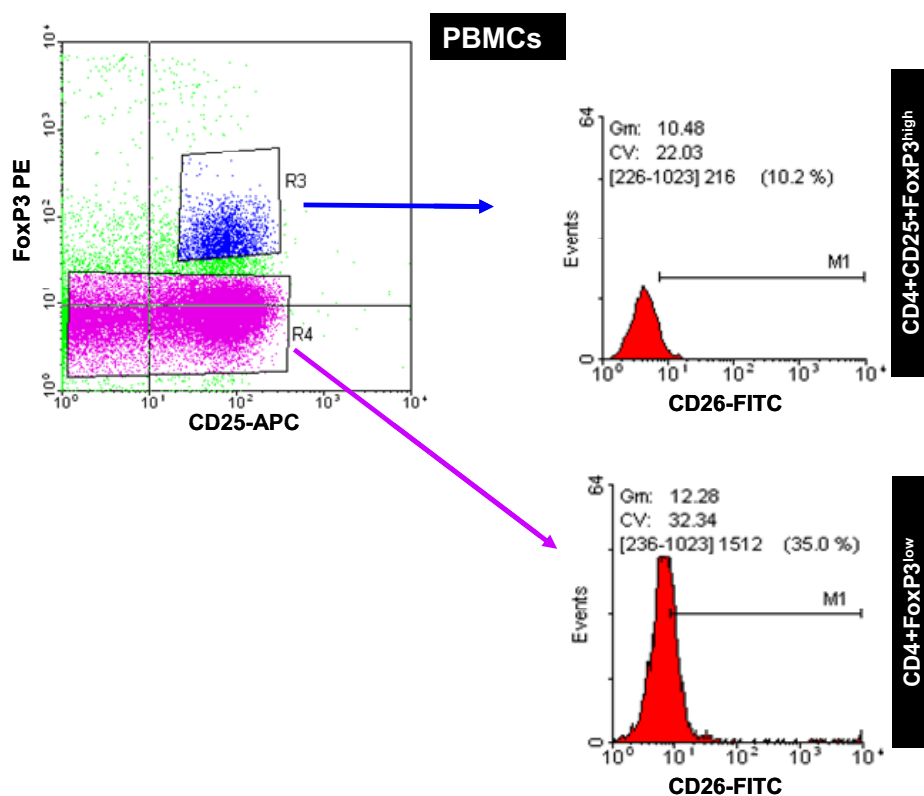
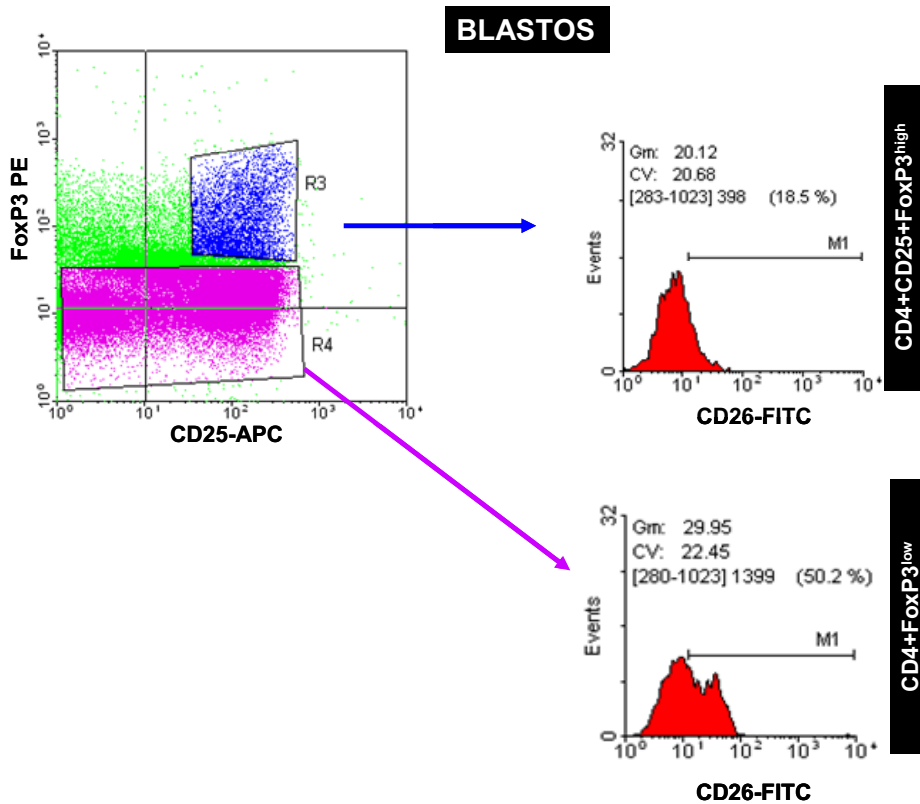


Figura 55. (ver pé en páxina seguinte)



**Figura 55. Expresión de CD26 en nTregs antes e depois da activación con PHA.** PBMCs extraídos de *buffy coats* e marcados cos anticorpos que aparecen na figura. Blastos procedentes do mesmo *buffy coat* e cultivados 5 días en presenza de 1  $\mu\text{g/ml}$  PHA. R3 (azul) representa a poboación reguladora con fenotipo  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^{\text{high}}$ , mentres que R4 (lila) inclúe a poboación de células T efectoras.

Cando foi analizada nas mesmas condicións a expresión de CD45RO (Figura 56), comprobouse que os niveis desta fosfatasa son aínda máis altos nas nTregs activadas que na poboación reguladora natural presente nas PBMCs en repouso. Ademais, tanto en PBMCs como en blastos, os niveis de expresión de CD45RO son da orde do dobre que nas células efectoras ( $\text{CD4}^+\text{FoxP3}^{\text{low/intermediate}}$ , R4), o que fai que non estén en estado anérxico como as Tregs.

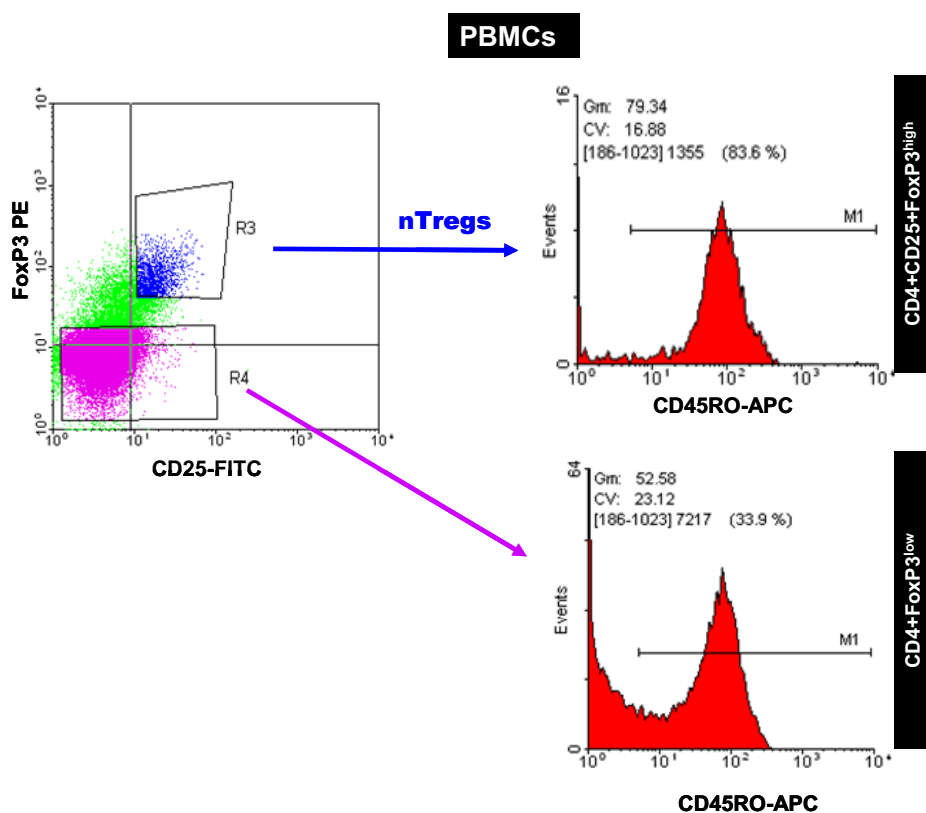
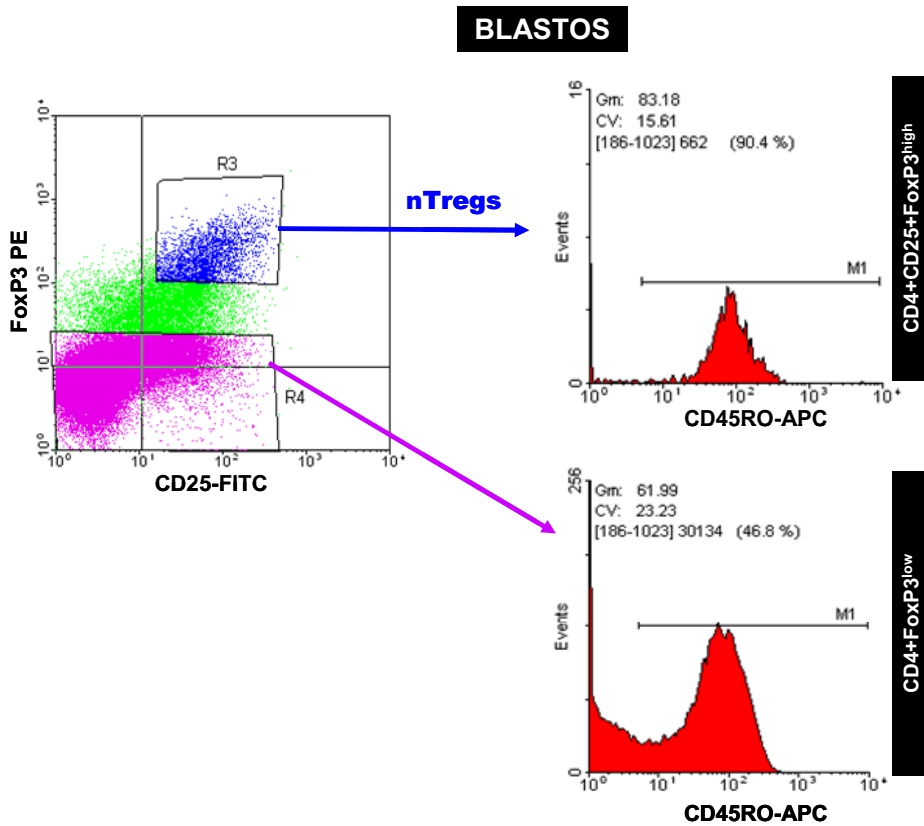


Figura 56. (ver pé en páxina seguinte)



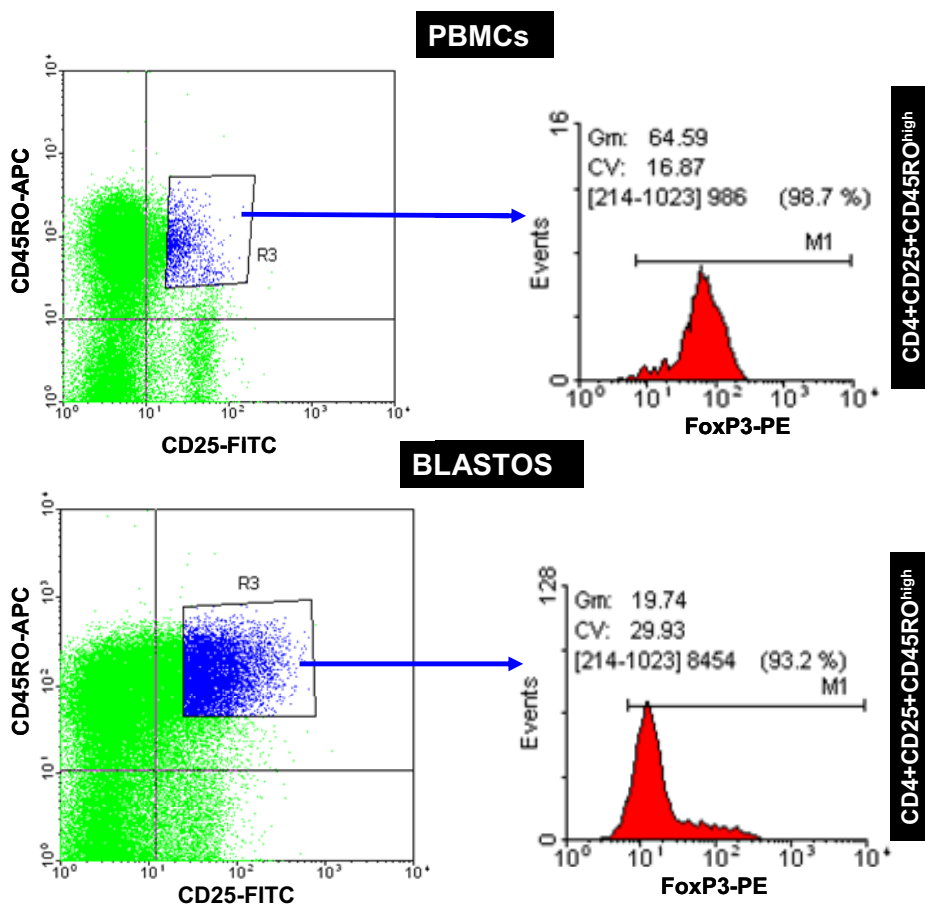


**Figura 56. Expresión de CD45RO en nTregs antes e depois da activación con PHA.** PBMCs extraídos de *buffy coats* e marcados cos anticorpos que aparecen na figura. Blastos procedentes do mesmo *buffy coat* e cultivados 5 días en presenza de 1  $\mu\text{g/ml}$  PHA. Partiu-se da rexión  $\text{CD4}^+$  e posteriormente seleccionáronse as rexións  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^{\text{high}}$  (R3, nTregs) e  $\text{CD4}^+\text{FoxP3}^{\text{low/intermediate}}$  (R4, células T efectoras).

Tamén se analizou a expresión de CD45RO e CD26 en nTregs coestimuladas con IL-12 sen que houbo diferenzas significativas (datos non amosados). Polo tanto, a activación celular ten efectos antagónicos no que respecta a expresión (IMF) de CD45RO nas células T reguladoras e efectoras, algo que probablemente está relacionado coa anergia e escasa proliferación das primeiras en comparación coas segundas.

#### 4. Resultados e discusión

Dado que a expresión de CD45RO se mantén elevada nas nTregs de xeito constante, independentemente do seu estado de activación, podería pensarse en utilizalo como marcador desta subpoboación celular, da que un 80% é CD45RO<sup>+</sup> (Baecher-Allan *et al.*, 2001) co que se excluíría un 20% das nTregs utilizando unicamente este marcador. Comprobámolo utilizando células CD4<sup>+</sup> e seleccionando, en base ó fenotipo CD25<sup>high</sup> e CD45RO<sup>high</sup>, a suposta poboación reguladora, e medindo os niveis de FoxP3 nesas células (R3, Figura 57).



**Figura 57. Fenotipado de nTregs usando CD45RO como marcador.** PBMCs extraídos de *buffy coats* e marcados cos anticorpos que aparecen na figura. Blastos procedentes do mesmo *buffy coat* e cultivados 5 días en presenza de 1 µg/ml PHA. A partir da rexión CD4<sup>+</sup> considerouse reguladora a poboación CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>.

Vemos que o uso de CD45RO como marcador (xunto con CD4 e CD25) permítenos distinguir unha poboación  $CD4^+CD25^+CD45RO^{high}$ , tanto en células activadas como sen activar, que expresan FoxP3 nunha alta porcentaxe, podendo ser consideradas nTregs.

Con todos estos datos podemos concluír que os linfocitos T efectores teñen unha alta expresión de CD26 pero unha baixa de CD45RO, menor canto máis activa sexa a súa taxa de división celular. En cambio, as células reguladoras naturais, que son anérxicas e non se dividen tan activamente, presentan valores inversos para ambas dúas moléculas, sendo  $CD26^{low}$  e  $CD45RO^{high}$ . A asociación en nTregs entre os baixos niveis de CD26, altos de CD45RO e unha mitoxénese reducida podería deberse a varias causas:

**a)** pola influencia que a interacción entre CD26 e CD45RO ten na propia localización de CD45RO (Ishii *et al.*, 2001). No caso de baixos niveis de CD26 (como nas nTregs), a distribución de CD45RO podería verse modificada ó estar reducida a asociación entre ambas moléculas, afectando así a actividade fosfatasa de CD45RO á proliferación dos linfocitos.

**b)** pola menor anclaxe de moléculas de ADA na superficie dos linfocitos, o que favorecería o efecto supresor da adenosina (substrato de ADA) sobre a proliferación (Deaglio *et al.*, 2007; Borsellino *et al.*, 2007). Por outra banda, ADA tamén se une ós receptores  $A_1R$  e  $A_{2b}R$ . No caso de que a expresión de CD26 esté diminuída, esta vía estaría máis activa (non haberá CD26 ó que poida unirse ADA), e como resultado final a interacción de ADA con estes receptores provocaría a produción de AMPc, que ten tamén un efecto inhibitorio da proliferación celular. Ademais, as nTregs expresan altos niveis tanto de CD39 como de CD73, ectonucleotidasas responsables de converter o ATP en AMP e adenosina, que se une ós receptores  $A_{2a}$  en células efectoras, suprimindo a súa función. Ó ter as Tregs baixos niveis de ADA, a adenosina non se

procesa e é a responsable de mediar os efectos supresores (Mandapathil *et al.*, 2010).

c) debido a relación entre CD26, CARMA-1 e NF- $\kappa$ B. CD26 interacciona con caveolina-1, unha proteína da superficie das células presentadoras de antígeno. Esta interacción desencadea no linfocito T un sinal que implica a activación de CARMA-1, a cal desemboca na sinalización a través de NF- $\kappa$ B e a transcripción do xen da IL-2, responsable conxuntamente con outras moléculas da proliferación celular.

d) polo efecto que os baixos niveis de CD26 poideran ter sobre a formación de dímeros de CD45RO, dacordo cos controvertidos traballos do grupo de Arthur Weiss (Ischii *et al.*, 2001; Xu & Weiss, 2002)

En todos estes casos o papel que CD26 desenvolvería na transducción de sinais ó interior do linfocito T sería o dunha molécula coestimuladora, ó nivel de CD28 ou CD2 por exemplo. Sen embargo, a función de CD26 podería ser máis complexa e depender do contexto celular, como se aprecia nos experimentos de interferencia, onde a eliminación do CD26 de nova síntese provoca unha maior proliferación celular e apunta a un posible papel inhibitorio de CD26. Neste sentido, a delección do xen de CD26 en ratos potencia a resposta antixénica, a proliferación celular e a produción de citocinas como IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ , reducindo en cambio a liberación de TGF $\beta$ 1 polas células; todo isto leva a unha maior susceptibilidade neses animais a desenvolver encefalomielite autoinmune experimental (Preller *et al.*, 2007). Similares conclusións foron obtidos con inhibidores da actividade enzimática como Pro-boropro (Bristol *et al.*, 1995) ou sulfostina (Abe *et al.*, 2005), que estimulan respectivamente a proliferación de timocitos ou a hepatopoiese en ratos.

Finalmente, as células efectoras que entran en contacto co antígeno específico (ou un mitóxeno) trocan paulatinamente o fenotipo

CD45RA<sup>+</sup> (naïve) por un fenotipo CD45RO<sup>+</sup> (memoria) e esta expresión de CD45RO redúcese significativamente nas células efectoras que están a proliferar continuamente, como se viu ó longo da tese, pero non sabemos se esta é unha causa ou un efecto dese mitoxénese tan activa.



# Conclusiones







Dos resultados obtidos ó longo destes cinco anos de traballo e presentados nesta tese de doutoramento podemos extraer as seguintes conclusións:

No referente á expresión de CD45RO podemos dicir que:

- A activación de linfocitos vía TCR provoca un aumento inicial da expresión de CD45RO, relacionada co procesamento alternativo do mRNA e co cambio de isoformas, e unha caída paulatina posterior asociada ós ciclos continuados de proliferación celular, á prolongada vida media da proteína e á lenta reciclaxe de CD45RO na superficie dos linfocitos. Ámbolos dous efectos son dependentes da potencia do sinal transmitido a través do TCR. Os estudos cinéticos revelan, ademais, a existencia dun comportamento bimodal.
- Tanto a citocina Th1 IL-12 como ADA modulan o efecto que a sinalización vía TCR ten na densidade de CD45RO na superficie celular.

No referente á localización de CD45RO na membrana plasmática dos linfocitos conclúese que:

- CD45RO e CD26 colocalizan fortemente nos linfocitos T activados vía TCR, feito que se ve reducido coa coestimulación con IL-12 ou ADA esóxenos.
- O control das funcións biolóxicas de CD45RO é exercido, polo menos en parte, a través do acercamento ou afastamento dos seus substratos. Neste sentido, a presenza ou ausencia de CD45RO nos microdominios *raft* pode ser importante. Así, a activación dos PBMCs, especialmente en presenza de IL-12 ou ADA, induce un forte desprazamento de CD45RO fóra dos *rafts* lipídicos.

No referente á proliferación celular dos linfocitos T pódese deducir que:

- Tanto a incubación con IL-12 ou ADA esóxenos potencian o efecto mitoxénico dos estímulos transmitidos a través do TCR, o que parece estar relacionado cos menores niveis de CD45RO.
- As células nTregs humanas, con fenotipo anérxico, expresan altos niveis de CD45RO e baixos de CD26, unha situación contraria á que presentan os linfocitos T efectores.
- A utilización de siRNAs específicos para o mensaxeiro de CD26 provoca a redución dos niveis de CD26 e CD45RO nos PBMCs activados, así como un aumento da proliferación, feito que se repite nos experimentos co inhibidor DpA. Estes datos apuntan a un posible papel inhibidor de CD26 e CD45RO.

# Bibliografía





- Abbas, A.K.; Murphy, K.M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383 (6603)**, 787-793 (1996).
- Abe, M.; Akiyama, T.; Umezawa, Y.; Yamamoto, K.; Nagai, M.; Yamazaki, H.; Ichikawa, Y. & Muraoka, Y. Synthesis and biological activity of sulphostin analogues, novel dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **13 (3)**, 785-797 (2005).
- Aderem, A. & Underhill, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593-623 (1999).
- Aerts, N.E.; Dombrecht, E.J.; Ebo, D.G.; Bridts, C.H.; Stevens, W.J. & De Clerck, L.S. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell. Immunol.* **251 (2)**, 109-115 (2008).
- Afkarian, M.; Sedy, J.R.; Yang, J.; Jacobson, N.G.; Cereb, N.; Yang, S.Y.; Murphy, T.L. & Murphy, K.M. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol.* **3 (6)**, 549-557 (2002).
- Ahlers, J.D.; Belyakov, I.M.; Matsui, S. & Berzofsky, J.A. Signals delivered through TCR instruct IL-12 receptor (IL-12R) expression: IL-12 and tumor necrosis factor- $\alpha$  synergize for IL-12R expression at low antigen dose. *Int. Immunol.* **13 (11)**, 1433-1442 (2001).
- Akbar, A.N.; Terry, L.; Timms, A.; Beverly, P.C. & Janossy, G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J. Immunol.* **140**, 2171-2178 (1988).
- Aldinucci, D.; Poletto, D.; Lorenzon, D.; Nanni, P.; Degan, M.; Olivo, K.; Rapana, B.; Pinto, A. & Gattei, V. CD26 expression correlates with a reduced sensitivity to 2-deoxycoformycin-induced growth inhibition and apoptosis in T-cell leukemia/lymphomas. *Clin. Cancer Res.* **10**, 508-520 (2004).

- Alexander, D.R. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Semin. Immunol.* **12**, 349-359 (2000).
- Alexander, W.S. & Hilton, D.J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 503-529 (2004).
- Allakhverdi, Z.; Fitzpatrick, D.; Boisvert, A.; Baba, N.; Bouguermouh, S.; Sarfati, M. & Delespesse, G. Expression of CD103 identifies human regulatory T-cell subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 1342-1349 (2006).
- Allan, S.E.; Crome, S.Q.; Crellin, N.K.; Passerini, L.; Steiner, T.S.; Bacchetta, R.; Roncarolo, M.G. & Levings, M.K. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* **19** (4), 345-354 (2007).
- Andersen, M.H.; Schrama, D.; Thor Straten, P. & Becker, J.C. Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* **126** (1), 32-41 (2006).
- Annacker, O.; Pimenta-Araujo, R.; Buren-Defranoux, O.; Barbosa, T.C.; Cumano, A. & Bandeira, A. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol.* **166** (5), 3008-3018 (2001).
- Ashwell, J.D. & D'Oro, U. CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different. *Immunol. Today* **20**, 412-416 (1999).
- Asseman, C.; Mauze, S.; Leach, M.W.; Coffman, R.L. & Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **190** (7), 995-1004 (1999).
- Aste-Amezaga, M.; D'Andrea, A.; Kubin, M. & Trinchieri, G. Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated

- molecules in human T and NK cells. *Cell. Immunol.* **156** (2), 480-492 (1994).
- Athie-Morales, V.; Smits, H.H.; Cantrell, D.A. & Hilkens, C.M. Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J. Immunol.* **172** (1), 61-69 (2004).
  - Bacon, C.M.; Petricoin, E.F. 3rd; Ortaldo, J.R.; Rees, R.C.; Larner, A.C.; Johnston, J.A. & O'Shea, J.J. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** (16), 7307-7311 (1995).
  - Bacon, C.M.; Cho, S.S. & O'Shea, J.J. Signal transduction by interleukin-12 and interleukin-2. A comparison and contrast. *Ann. NY Acad. Sci.* **31** (795), 41-59 (1996).
  - Baecher-Allan, C.; Brown, J.A.; Freeman, G.J. & Hafler, D.A. CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* **167** (3), 1245-1253 (2001).
  - Badizadegan, K.; Wolf, A.A.; Rodighiero, C.; Jobling, M.; Hirst, T.R.; Holmes, R.K. & Lencer, W.I. Floating cholera toxin into epithelial cells: functional association with caveolae-like detergent-insoluble membrane microdomains. *Int. J. Med. Microbiol.* **290** (4-5), 403-408 (2008).
  - Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* **392** (6676), 565-568 (1998).
  - Baumann, H. & Gauldie, J. The acute phase response. *Immunol. Today.* **15** (2), 74-80 (1994).
  - Bauvois, B.; De Meester, I.; Dumont, J.; Rouillard, D.; Zhao, H.X. & Bosmans, E. Constitutive expression of CD26/dipeptidylpeptidase IV on peripheral blood B lymphocytes of patients with B chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Cancer.* **79** (7-8), 1042-1048 (1999).

- Bednarczyk, J.L.; Carroll, S.M.; Marin, C. & McIntyre, B.W. Triggering of the proteinase dipeptidyl peptidase IV (CD26) amplifies human T lymphocyte proliferation. *J. Cell. Biochem.* **46 (3)**, 206-218 (1991).
- Bernstein, E.; Denli, A.M. & Hannon, G.J. The rest is silence. *RNA*. **7 (11)**, 1509-1521 (2001).
- Bettelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T.B.; Oukka, M.; Weiner, H.L. & Kuchroo, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. **441 (7090)**, 235-238 (2006).
- Bijlmakers, M.J. Protein acylation and localization in T cell signaling. *Mol. Membr. Biol.* **26 (1)**, 93-103 (2009).
- Birkeland, M.L.; Johnson, P.; Trowbridge, I.S. & Pure, E. Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 6734-6738 (1989).
- Blazquez, M.V.; Madueño, J.A.; Gonzalez, R.; Jurado, R.; Bachovchin, W.W.; Peña, J. & Muñoz, E. Selective decrease of CD26 expression in T cells from HIV-1-infected individuals. *J. Immunol.* **149 (9)**, 3073-3077 (1992).
- Boonacker, E. & Van Noorden, C.J The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur. J. Cell. Biol.* **82 (2)**, 53-73 (2003).
- Boraschi, D. & Tagliabue, A. The interleukin-1 receptor family. *Vitam. Horm.* **74**, 229-254 (2006).
- Borsellino, G.; Kleinewietfeld, M.; Di Mitri, D.; Sternjak, A.; Diamantini, A.; Giometto, R.; Höpner, S.; Centonze, D.; Bernardi, G.; Dell'Acqua, M.L.; Rossini, P.M.; Battistini, L.; Rötzschke, O. & Falk, K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. **110 (4)**, 1225-1232 (2007).



- Boulay, J.L. & Paul, W.E. The interleukin-4-related lymphokines and their binding to hematopoietin receptors. *J. Biol. Chem.* **267** (29), 20525-20528 (1992).
- Bøyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21**, 77-89 (1968).
- Bristol, L.A.; Bachovchin, W. & Takács, L. Inhibition of CD26 enzyme activity with pro-boropro stimulates rat granulocyte/macrophage colony formation and thymocyte proliferation in vitro. *Blood.* **85** (12), 3602-3609 (1995).
- Brown, D.A. & Rose, J.K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, **68**: 533-544 (1992).
- Bystry, R.S.; Aluvihare, V.; Welch, K.A.; Kallikourdis, M. & Betz, A.G. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat. Immunol.* **2** (12), 1126-1132 (2001).
- Canda-Sánchez, A.; Salgado, F.J.; Pérez-Díaz, A.; Varela-González, C.; Arias, P. & Nogueira, M. Differential distribution of both IL-12Rbeta chains in the plasma membrane of human T cells. *J. Membr. Biol.* **227** (1), 1-12 (2009a).
- Canda-Sánchez, A.; Salgado, F.J.; Pérez-Díaz, A.; Varela-González, C.; Arias, P. & Nogueira, M. IL-12 dependent activation of ERK1/2 in human T lymphoblasts. *Immunobiology.* **214** (3), 187-196 (2009b).
- Cantrell, D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 259-274 (1996).
- Cao, X.; Cai, S.F.; Fehniger, T.A.; Song, J.; Collins, L.I.; Piwnica-Worms, D.R. & Ley, T.J. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* **27**, 635-646 (2007).

- Carrier, Y.; Yuan, J.; Kuchroo, V.K. & Weiner, H.L. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J. Immunol.* **178** (1), 179-185 (2007).
- Chan, S.H.; Perussia, B.; Gupta, J.W.; Kobayashi, M.; Pospíšil, M.; Young, H.A.; Wolf, S.F.; Young, D.; Clark, S.C. & Trinchieri G. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* **173** (4), 869-879 (1991).
- Chan, S.H.; Kobayashi, M.; Santoli, D.; Perussia, B. & Trinchieri, G. Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J. Immunol.* **148** (1), 92-98 (1992).
- Chang, J.T.; Segal, B.M.; Nakanishi, K.; Okamura, H. & Shevach, E.M. The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit. *Eur. J. Immunol.* **30** (4), 1113-1119 (2000).
- Chen, W.; Jin, W.; Hardegen, N.; Lei, K.J.; Li, L.; Marinos, N.; McGrady, G. & Wahl, S.M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198** (12), 1875-1886 (2003).
- Cheng, P.C.; Dykstra, M.L.; Mitchell, R.N. & Pierce, S.K. A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signalling and antigen targeting. *J. Exp. Med.* **190**, 1549-1560 (1999).
- Cohen, A.C.; Nadeau, K.C.; Tu, W.; Hwa, V.; Dionis, K.; Bezrodnik, L.; Teper, A.; Gaillard, M.; Heinrich, J.; Krensky, A.M.; Rosenfeld, R.G. & Lewis, D.B. Cutting edge: Decreased accumulation and regulatory

- function of CD4<sup>+</sup> CD25(high) T cells in human STAT5b deficiency. *J. Immunol.* **177**, 2770-2774 (2006).
- Collison, L.W.; Workman, C.J.; Kuo, T.T.; Boyd, K.; Wang, Y.; Vignali, K.M.; Cross, R.; Sehy, D.; Blumberg, R.S. & Vignali, D.A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* **450 (7169)**, 566-569 (2007).
  - Collison, L.W. & Vignali, D.A. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol. Rev.* **226**, 248-62 (2008).
  - Cordero, O.J.; Salgado, F.J. & Nogueira, M. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2 in biological fluids. *Eur. Respir. J.* **10 (9)**, 2186-2187 (1997a).
  - Cordero, O.J.; Salgado, F.J.; Viñuela, J.E. & Nogueira, M. Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes. *Immunobiology.* **197 (5)**, 522-33 (1997b).
  - Cordero, O.J.; Salgado, F.J.; Viñuela, J.E. & Nogueira, M. Interleukin-12-dependent activation of human lymphocyte subsets. *Immunol. Lett.* **61 (1)**, 7-13 (1998).
  - Cordero, O.J.; Salgado, F.J.; Fernández-Alonso, C.M.; Herrera, C.; Lluís, C.; Franco, R. & Nogueira, M. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* **70 (6)**, 920-930 (2001a).
  - Cordero, O.J.; Salgado, F.J.; Mera-Varela, A. & Nogueira, M. Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* **21(2)**, 69-74 (2001b).
  - Csutora, P.; Zarayskiy, V.; Peter, K.; Monje, F.; Smani, T.; Zakharov, S.I.; Litvinov, D. & Bolotina, V.M. Activation mechanism for CRAC current and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: calcium influx factor and Ca<sup>2+</sup>-

- independent phospholipase A2beta-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* **281 (46)**, 34926-34935 (2006).
- D'Andrea, A.; Rengaraju, M.; Valiante, N.M.; Chehimi, J.; Kubin, M.; Aste, M.; Chan, S.H.; Kobayashi, M.; Young, D.; Nickbarg, E., *et al.* Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* **176 (5)**, 1387-1398 (1992).
  - Dang, N.H.; Torimoto, Y.; Sugita, K.; Daley, J.F.; Schow, P.; Prado, C.; Schlossman, S.F. & Morimoto, C. Cell surface modulation of CD26 by anti-1F7 monoclonal antibody. Analysis of surface expression and human T cell activation. *J. Immunol.* **145 (12)**, 3963-3971 (1990).
  - Davis, M.M. A new trigger for T cells. *Cell.* **110 (3)**, 285-287 (2002).
  - De Meester, I.; Vanham, G.; Kestens, L.; Vanhoof, G.; Bosmans, E.; Gigase, P. & Scharpé, S. Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26. *Eur. J. Immunol.* **24 (3)**, 566-570 (1994).
  - De Meester, I.A.; Kestens, L.L.; Vanham, G.L.; Vanhoof, G.C.; Vingerhoets, J.H.; Gigase, P.L. & Scharpé, S.L. Costimulation of CD4+ and CD8+ T cells through CD26: the ADA-binding epitope is not essential for complete signaling. *J. Leukoc. Biol.* **58(3)**, 325-330 (1995).
  - Deaglio, S.; Dwyer, K.M.; Gao, W.; Friedman, D.; Usheva, A.; Erat, A.; Chen, J.F.; Enjyoji, K.; Linden, J.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K.; Strom, T.B. & Robson, S.C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204 (6)**, 1257-1265 (2007).
  - Deane, J.A. & Fruman, D.A. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 563-598 (2004).

- Deans, J.P.; Boyd, A.W. & Pilarski, M. Transitions from high to low molecular weight isoforms of CD45 (T200) involve rapid activation of alternate mRNA splicing and slow turnover of surface CD45R. *J. Immunol.* **143**, 1233-1238 (1989).
- DeBlaker-Hohe, D.F.; Yamauchi, A.; Yu, C.R.; Horvath-Arcidiacono, J.A. & Bloom, E.T. IL-12 synergizes with IL-2 to induce lymphokine-activated cytotoxicity and perforin and granzyme gene expression in fresh human NK cells. *Cell. Immunol.* **165 (1)**, 33-43 (1995).
- Del Vecchio M.; Bajetta, E.; Canova, S.; Lotze, M.T.; Wesa, A.; Parmiani, G. & Anichini, A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin. Cancer Res.* **13 (16)**, 4677-4685 (2007).
- Dempsey, P.W.; Doyle, S.E.; He, J.Q. & Cheng, G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14 (3-4)**, 193-209 (2003).
- Desai, B.B.; Quinn, P.M.; Wolitzky, A.G.; Mongini, P.K.; Chizzonite, R. & Gately, M.K. IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J. Immunol.* **148 (10)**, 3125-3132 (1992).
- Dhodapkar, K.M.; Barbuto, S.; Matthews, P.; Kukreja, A.; Mazumder, A.; Vesole, D.; Jagannath, S. & Dhodapkar, M.V. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood.* **112 (7)**, 2878-2885 (2008).
- Diefenbach, A.; Schindler, H.; Röllinghoff, M.; Yokoyama, W.M. & Bogdan, C. Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. *Science.* **284 (5416)**, 951-955 (1999).
- Dinjens, W.N.; ten-Kate, J.; van-der-Linden, E.P.; Wijnen, J.T.; Khan, P.M. & Bosman, F.T. Distribution of adenosine deaminase complexing protein (ADCP) in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **37**, 1869-1875 (1989).

## 6. Bibliografia

---

- Dobers, J.; Grams, S.; Reutter, W. & Fan, H. Roles of cysteines in rat in dipeptidyl peptidase IV/CD26 in processing and proteolytic activity. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5093-5100 (2000).
- Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat. Rev. Immunol.* **8** (5), 337-348 (2008).
- Dong, R.P.; Kameoka, J.; Hegen, M.; Tanaka, T.; Xu, Y.; Schlossman, S.F. & Morimoto, C. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J. Immunol.* **156** (4), 1349-1355 (1996).
- Dong, R.P.; Tachibana, K.; Hegen, M.; Munakata, Y.; Cho, D.; Schlossman, S.F. & Morimoto, C. Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation. *J. Immunol.* **159** (12), 6070-6076 (1997).
- Dustin, M.L.; Olszowy, M.W.; Holdorf, A.D.; Li, J.; Bromley, S.; Desai, N.; Widder, P.; Rosenberger, F.; van der Merwe, P.A.; Allen, P.M. & Shaw, A.S. A novel adapter protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T cell contacts, *Cell* **94**, 667–677 (1998).
- Dustin, M.L.; Bromley, S.K.; Davis, M.M. & Zhu, C. Identification of self through two-dimensional chemistry and synapses. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **17**, 133-157 (2001).
- Edidin, M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257-283 (2003).
- Edmonds, S.D. & Ostergaard, H.L. Dynamic association of CD45 with detergent-insoluble microdomains in T lymphocytes. *J. Immunol.* **169** (9), 5036-5042 (2002).
- Ermann, J.; Hoffmann, P.; Edinger, M.; Dutt, S.; Blankenberg, F.G.; Higgins, J.P.; Negrin, R.S.; Fathman, C.G. & Strober, S. Only the

- CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood*. **105**, 2220-2226 (2005).
- Eyles, J.L.; Metcalf, D.; Grusby, M.J.; Hilton, D.J. & Starr, R. Negative regulation of interleukin-12 signaling by suppressor of cytokine signaling-1. *J. Biol. Chem.* **277** (46), 43735-43740 (2002).
  - Fan, H.; Meng, W.; Kilian, C.; Grams, S. & Reutter, W. Domain-specific N-glycosylation of the membrane glycoprotein dipeptidylpeptidase IV (CD26) influences its subcellular trafficking, biological stability, enzyme activity and protein folding. *Eur. J. Biochem.* **246** (1), 243-251 (1997).
  - Fleischer, B. CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol. Today* **15**, 180-184 (1994).
  - Flores-Borja, F.; Jury, E.C.; Mauri, C. & Ehrenstein, M.R. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **105** (49), 19396-16401 (2008).
  - Fontenot, J.D.; Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4** (4), 330-336 (2003).
  - Fontenot, J.D. & Rudensky, A.Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.* **6** (4), 331-337 (2005).
  - Franco, R.; Casadó, V.; Ciruela, F.; Saura, C.; Mallol, J.; Canela, E.I. & Lluís, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog. Neurobiol.* **52** (4), 283-294 (1997).
  - Franco, R.; Valenzuela, A.; Lluís, C. & Blanco, J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol. Rev.* **161**, 27-42 (1998).

## 6. Bibliografia

---

- Frucht, D.M.; Fukao, T.; Bogdan, C.; Schindler, H.; O'Shea, J.J. & Koyasu, S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* **22 (10)**, 556-560 (2001).
- Gaide, O.; Favier, B.; Legler, D.F.; Bonnet, D.; Brissoni, B.; Valitutti, S.; Bron, C.; Tschopp, J. & Thome, M. CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* **3 (9)**, 836-843 (2002).
- Gately, M.K.; Desai, B.B.; Wolitzky, A.G.; Quinn, P.M.; Dwyer, C.M.; Podlaski, F.J.; Familletti, P.C.; Sinigaglia, F.; Chizzonite, R.; Gubler, U., *et al.* Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.* **147 (3)**, 874-882 (1991).
- Gately, M.K.; Wolitzky, A.G.; Quinn, P.M. & Chizzonite, R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell. Immunol.* **143 (1)**, 127-142 (1992).
- Gately, M.K.; Renzetti, L.M.; Magram, J.; Stern, A.S.; Adorini, L.; Gubler, U. & Presky, D.H. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 495-521 (1998).
- Gazzinelli, R.T.; Wysocka, M.; Hayashi, S.; Denkers, E.Y.; Hieny, S.; Caspar, P.; Trinchieri, G. & Sher, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **153 (6)**, 2533-2543 (1994).
- Gearing, D.P. & Cosman, D. Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor. *Cell* **66 (1)**, 9-10 (1991).
- Gehr, G.; Braun, T. & Lesslauer, W. Cytokines, receptors, and inhibitors. *Clin. Investig.* **70 (1)**, 64-69 (1992).



- Gerli, R.; Muscat, C.; Bertotto, A.; Bistoni, O.; Agea, E.; Tognellini, R.; Fiorucci, G.; Cesarotti, M. & Bombardieri, S. CD26 surface molecule involvement in T cell activation and lymphokine synthesis in rheumatoid and other inflammatory synovitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **80 (1)**, 31-37 (1996).
- Gershon, R.K. & Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, **18 (5)**, 723-737 (1970).
- Gervais, F.G.; Chow, L.M.; Lee, J.M.; Branton, P.E. & Veillette, A. The Sh2 domain is required for stable phosphorylation of p56lck at tyrosine 505, the negative regulatory site. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7112-7121 (1993).
- Gil, D.; Schamel, W.W.; Montoya, M.; Sánchez-Madrid, F. & Alarcón, B. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell*. **109 (7)**, 901-912 (2002).
- Ginés, S.; Mariño, M.; Mallol, J.; Canela, E.I.; Morimoto, C.; Callebaut, C.; Hovanessian, A.; Casadó, V.; Lluís, C. & Franco R. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *Biochem. J.* **361 (2)**, 203-209 (2002).
- Gollob, J.A.; Veenstra, K.G.; Jyonouchi, H.; Kelly, A.M.; Ferrieri, P.; Panka, D.J.; Altare, F.; Fieschi, C.; Casanova, J.L.; Frank, D.A. & Mier, J.W. Impairment of STAT activation by IL-12 in a patient with atypical mycobacterial and staphylococcal infections. *J. Immunol.* **165 (7)**, 4120-4126 (2000).
- Gorrell, M.D.; Gysbers, V. & McCaughan, G.W. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **54 (3)**, 249-264 (2001).

## 6. Bibliografia

---

- Grakoui, A.; Bromley, S.K.; Sumen, C.; Davis, M.M.; Shaw, A.S.; Allen, P.M.; & Dustin, M.L. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285 (5425)**, 221-227 (1999).
- Green, H. & Chan, T. Pyrimidine starvation induced by adenosine in fibroblasts and lymphoid cells: role of adenosine deaminase. *Science*. **182 (114)**, 836-837 (1976).
- Grossman, W.J.; Verbsky, J.W.; Barchet, W.; Colonna, M.; Atkinson, J.P. & Ley, T.J. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. **21**, 589-601 (2004).
- Gruss, H.J. & Dower, S.K. The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines Mol. Ther.* **1 (2)**, 75-105 (1995).
- Hammond, S.M.; Boettcher, S.; Caudy, A.A.; Kobayashi, R. & Hannon, G.J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. **293 (5532)**, 1146-1150 (2001).
- Hanada, K.; Nishijima, M.; Akamatsu, Y. & Paganop, R.E. Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in mammalian membranes. *J. Biol. Chem.* **270 (11)**, 6254-6260 (1995).
- Hannon, G.J. RNA interference. *Nature*. **418 (6894)**, 244-251 (2002).
- Harrington, L.E.; Hatton, R.D.; Mangan, P.R.; Turner, H.; Murphy, T.L.; Murphy, K.M. & Weaver, C.T. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6 (11)**, 1123-1132 (2005).
- Hartel, S.; Gossrau, R.; Hanski, C. & Reutter, W. Dipeptidyl peptidase (DPP) IV in rat organs. Comparison of immunohistochemistry and activity histochemistry. *Histochemistry*, **89**, 151-161 (1988).
- Hegedus, Z.; Chitu, V.; Toth, G.K.; Finta, C.; Varadi, G.; Ando, I. & Monostori, E. Contribution of kinases and the CD45 phosphatase to

- the generation of tyrosine phosphorylation patterns in the T-cell receptor complex zeta chain. *Immunol. Lett.* **67**, 31-39 (1999).
- Hegen, M.; Kameoka, J.; Dong, R.P.; Schlossman, S.F. & Morimoto, C. Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. *Immunology.* **90** (2), 257-264 (1997).
  - Helms, J.B. & Zurzolo, C. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* **5** (4), 247-254 (2004).
  - Hermiston, M.L.; Xu, Z.; Majeti, R. & Weiss, A. Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *J. Clin. Invest.* **109**, 9-14 (2002).
  - Hermiston, M.L.; Xu, Z. & Weiss, A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 107-137 (2003).
  - Hermiston, M.L.; Zikherman, J. & Zhu, J.W. CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunol. Rev.* **228** (1), 288-311 (2009).
  - Hirahara, K.; Liu, L.; Clark, R.A.; Yamanaka, K.; Fuhlbrigge, R.C. & Kupper, T.S. The majority of human peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J. Immunol.* **177**, 4488-4494 (2006).
  - Hochrein, H.; O'Keeffe, M.; Luft, T.; Vandenabeele, S.; Grumont, R.J.; Maraskovsky, E. & Shortman, K. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192** (6), 823-33 (2000).
  - Hodgkin, P.D.; Lee, J.H. & Lyons, A.B. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J. Exp. Med.* **184** (1), 277-281 (1996).

## 6. Bibliografia

---

- Hoekstra, D.; Maier, O.; van der Wouden, J.M.; Slimane, T.A. & van Ijzendoorn, S.C. Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids. *J. Lipid Res.* **44**, 869-877 (2003).
- Hogan, P.G.; Lewis, R.S. & Rao, A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 491-533 (2010).
- Holmes, N. CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology.* **117 (2)**, 145-155 (2006).
- Horejsí, V.; Drbal, K.; Cebecauer, M.; Cerný, J.; Brdicka, T.; Angelisová, P. & Stockinger, H. GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol. Today*, **20 (8)**, 356-61 (1999).
- Hori, S.; Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* **299 (5609)**, 1057-1061 (2003).
- Hori, S. Rethinking the molecular definition of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **38**, 901-937 (2008).
- Horwitz, D.A.; Zheng, S.G. & Gray, J.D. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends. Immunol.* **29 (9)**, 429-435 (2008).
- Hovi, T.; Smyth, J.F.; Allison, A.C. & Williams, S.C. Role of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* **23 (3)**, 395-403 (1976).
- Hovis, R.R.; Donovan, J.A.; Musci, M.A.; Motto, D.G.; Goldman, F.D.; Ross, S.E. & Koretzky, G.A. Rescue of signaling by a chimeric protein containing the cytoplasmatic domain of CD45. *Science*, **260**, 544-546 (1993).
- Hsieh, C.S.; Macatonia, S.E.; Tripp, C.S.; Wolf, S.F.; O'Garra, A. & Murphy, K.M. Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12

- p produced by
- Listeria*
- induced macrophages.
- Science*
- 260**
- (5107), 547-549 (1993).
- Huang, C.T.; Workman, C.J.; Flies, D.; Pan, X.; Marson, A.L.; Zhou, G.; Hipkiss, E.L.; Ravi, S.; Kowalski, J.; Levitsky, H.I.; Powell, J.D.; Pardoll, D.M.; Drake, C.G. & Vignali, D-A.. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. **21**, 503-513 (2004).
  - Humphrey, P.P. The characterization and classification of receptors. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **18** (4-6), 345-362 (1998).
  - Hühn, J.; Olek, S.; Fleischer, B. & von Bonin, A. The adenosine deaminase-binding region is distinct from major anti-CD26 mAb epitopes on the human dipeptidyl peptidase IV(CD26) molecule. *Cell. Immunol.* **192** (1), 33-40 (1999).
  - Ihle, J.N.; Nosaka, T.; Thierfelder, W.; Quelle, F.W. & Shimoda, K. Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells* **15** (1), 105-111 (1997).
  - Ilangumaran, S.; Briol, A. & Hoessli, D.C. Distinct interactions among GPI-anchored, transmembrane and membrane associated intracellular proteins, and sphingolipids in lymphocyte and endothelial cell plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1328** (2), 227-236 (1997).
  - Ilangumaran, S.; Arni, S.; van Echten-Deckert, G.; Borisch, B. & Hoessli, D.C. Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes. *Mol. Biol. Cell.* **10** (4), 891-905 (1999).
  - Ilangumaran, S.; He, H.T. & Hoessli, D.C. Microdomains in lymphocyte signaling: beyond GPI-anchored proteins. *Immunol. Today* **21**, 2-7 (2000).
  - Imler, J.L. & Hoffmann, J.A. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell. Biol.* **11** (7), 304-311 (2001).

## 6. Bibliografia

---

- Irie-Sasaki, J.; Sasaki, T.; Matsumoto, W.; Opavsky, A.; Cheng, M.; Welstead, G.; Griffiths, E.; Krawczyk, C.; Richardson, C.D.; Aitken, K.; Iscove, N.; Koretzky, G.; Johnson, P.; Liu, P.; Rothstein, D.M. & Penninger, J.M. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* **409**, 349-354 (2001).
- Ishii, T.; Ohnuma, K.; Murakami, A.; Takasawa, N.; Kobayashi, S.; Dang, N.H.; Schlossman, S.F. & Morimoto, C. CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98** (21), 12138-12143 (2001).
- Ivanov, I.I.; McKenzie, B.S.; Zhou, L.; Tadokoro, C.E.; Lepelley, A.; Lafaille, J.J.; Cua, D.J. & Littman D.R. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126** (6), 1121-1133 (2006).
- Jacobson, N.G.; Szabo, S.J.; Weber-Nordt, R.M.; Zhong, Z.; Schreiber, R.D.; DRNAell, J.E. Jr & Murphy, K.M. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J. Exp. Med.* **181**, 1755-1762 (1995).
- Jacobson, K.; Mouritsen, O.G. & Anderson, R.G. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat. Cell. Biol.* **9** (1), 7-14 (2007).
- Janes, P.W.; Ley, S.C. & Magee, A.I. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* **147**, 447-461 (1999).
- Janes, P.W.; Ley, S.C.; Magee, A.I. & Kabouridis, P.S. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin. Immunol.* **12** (1), 23-34 (2000).

- Jinushi, M. & Tahara, H. Cytokine gene-mediated immunotherapy: current status and future perspectives. *Cancer Sci.* **100 (8)**, 1389-1396 (2009).
- Johnson, K.G.; Bromley, S.K.; Dustin, M.L. & Thomas, M.L. A supramolecular basis for CD45 tyrosine phosphatase regulation in sustained T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97 (18)**, 10138-10143 (2000).
- Jun, J.E. & Goodnow, C.C. Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. *Nat. Immunol.* **4 (11)**, 1057-1064 (2003).
- Kabouridis, P.S. Lipid rafts in T cell receptor signalling. *Mol. Memb. Biol.* **23 (1)**, 49-57 (2006).
- Kahne, T.; Lendeckel, U.; Wrenger, S.; Neubert, K.; Ansorge, S. & Reinhold, D. Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth. *Int. J. Mol. Med.* **4 (1)**, 3-15 (1999).
- Kameoka, J.; Tanaka, T; Nojima, Y.; Schlossman, S.F. & Morimoto, C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science.* **261**, 466-469 (1993).
- Kane, L.P.; Lin, J. & Weiss, A. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* **12 (3)**, 242-249 (2000).
- Kane, L.P.; Lin, J. & Weiss, A. It's all rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends. Immunol.* **23**, 413-420 (2002).
- Kaplan, M.H.; Sun, Y.L.; Hoey, T. & Grusby, M.J. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* **382 (6587)**, 174-177 (1996).
- Karaghiosoff, M.; Neubauer, H.; Lassnig, C.; Kovarik, P.; Schindler, H.; Pircher, H.; McCoy, B.; Bogdan, C.; Becker, T.; Brem, G.; Pfeffer, K. &

- Müller, M. Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity*. **13** (4), 549-560 (2000).
- Kenny, A.J.; Booth, A.G.; George, S.G.; Ingram, J.; Kershaw, D.; Wood, E.J. & Young, A.R. Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase. *Biochem. J.* **157**, 169-182 (1976).
  - Khattry, R.; Cox, T.; Yasayko, S.A. & Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* **4** (4), 337-342 (2003).
  - King, C.; Tangye, S.G. & Mackay, C.R. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 741-766 (2008).
  - Kleinewietfeld, M.; Starke, M.; Di Mitri, D.; Borsellino, G.; Battistini, L.; Röttschke, O. & Falk, K. CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood*. **113** (4), 827-836 (2008).
  - Kobayashi, M.; Fitz, L.; Ryan, M.; Hewick, R.M.; Clark, S.C.; Chan, S.; Loudon, R.; Sherman, F.; Perussia, B. & Trinchieri, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170** (3), 827-845 (1989).
  - Koegl, M.; Zlatkine, P.; Ley, S.C.; Courtneidge, S.A. & Magee, A.I. Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem. J.* **303** (3), 749-753 (1994).
  - Kostense, S.; Sun, W.H.; Cottey, R.; Taylor, S.F.; Harmeling, S.; Zander, D.; Small, P.A. Jr. & Bender, B.S. Interleukin 12 administration enhances Th1 activity but delays recovery from influenza A virus infection in mice. *Antiviral Res.* **38** (2), 117-130 (1998).



- Koretzky, G.A.; Picus, J.; Thomas, M.L. & Weiss, A. Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T cell antigen receptor to the phosphatidylinositol pathway. *Nature*. **346**, 66-68 (1990).
- Korn, T.; Bettelli, E.; Oukka, M. & Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 485-517 (2009).
- Kotenko, S.V. & Pestka, S. Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes. *Oncogene*. **19 (21)**, 2557-2565 (2000).
- Kriegel, M.A.; Tretter, T.; Blank, N.; Schiller, M.; Gabler, C.; Winkler, S.; Kalden, J.R. & Lorenz, H.M. Interleukin-4 supports interleukin-12-induced proliferation and interferon-gamma secretion in human activated lymphoblasts and T helper type 1 cells. *Immunol.* **119**, 43-53 (2006).
- Kubin, M.; Kamoun, M. & Trinchieri, G. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J. Exp. Med.* **180 (1)**, 211-222 (1994).
- Kung, C.; Pingel, J.T.; Heikinheimo, M.; Klemola, T.; Varkila, K.; Yoo, L.I.; Vuopala, K.; Poyhonen, M.; Uhari, M.; Rogers, M.; Speck, S.H.; Chatila, T. & Thomas, M.L. Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat. Med.* **6 (3)**, 343-345 (2000).
- Kyewski, B. & Suri-Payer, E. CD4+CD25+ regulatory T cells: origin, function, and therapeutic potential. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2005).
- Langrish, C.L.; McKenzie, B.S.; Wilson, N.J.; de Waal Malefyt, R.; Kastelein, R.A. & Cua, D.J. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **202**, 96-105 (2004).
- Lanzavecchia, A.; Lezzi, G. & Viola, A. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell*. **96 (1)**, 1-4 (1999).

## 6. Bibliografia

---

- Latour, S. & Veillette, A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 299-306 (2001).
- Leder, G.H.; Oppenheim, M.; Rosenstein, M.; Lotze, M.T. & Beger, H.G. Addition of interleukin 12 to low dose interleukin 2 treatment improves antitumor efficacy in vivo. *Z. Gastroenterol.* **33** (9), 499-502 (1995).
- Leonard, W.J. & O'Shea, J.J. Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 293-322 (1998).
- Levings, M.K.; Sangregorio, R.; Galbiati, F.; Squadrone, S.; de Waal Malefyt, R. & Roncarolo, M.G. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J. Immunol.* **166**, 5530-5539 (2001).
- Lewis, R.S. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 497-521 (2001).
- Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**(5961), 46-50 (2010).
- Liang, X.; Nazarian, A.; Erdjument-Bromage, H.; Bornmann, W.; Tempst, P. & Resh, M.D. Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J. Biol. Chem.* **276** (33), 30987-30994 (2001).
- Lighvani, A.A.; Frucht, D.M.; Jankovic, D.; Yamane, H.; Aliberti, J.; Hissong, B.D.; Nguyen, B.V.; Gadina, M.; Sher, A.; Paul, W.E. & O'Shea, J.J. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **8** (26), 15137-15142 (2001).
- Lim, H.W.; Broxmeyer, H.E. & Kim, C.H. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **177**, 840-851 (2006).

- Lim, H.W. & Kim, C.H. Loss of IL-7 receptor alpha on CD4+ T cells defines terminally differentiated B cell-helping effector T cells in a B cell-rich lymphoid tissue. *J. Immunol.* **179 (11)**, 7448-7456 (2007).
- Lin, J. & Weiss, A. T cell receptor signalling. *J. Cell. Sci.*, **114 (2)**, 243-244 (2001).
- Liu, W.; Putnam, A.L.; Xu-Yu, Z.; Szot, G.L.; Lee, M.R.; Zhu, S.; Gottlieb, P.A.; Kapranov, P.; Gingeras, T.R.; Fazekas de St Groth, B.; Clayberger, C.; Soper, D.M.; Ziegler, S.F. & Bluestone, J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* **203 (7)**, 1701-1711 (2006).
- Lojo, J.; Salgado, F.J.; Nogueira, M. & Cordero, O.J. CD26 is involved in the regulation of T-cell plasma membrane compartmentation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **524**, 145-153 (2003).
- Lynch, K.W. & Weiss, A. A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates PKC and Ras. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 70-80 (2000).
- Ma, X.; Chow, J.M.; Gri, G.; Carra, G.; Gerosa, F.; Wolf, S.F.; Dzialo, R. & Trinchieri, G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J. Exp. Med.* **183 (1)**, 147-57 (1996).
- Ma, X. & Trinchieri, G. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Adv. Immunol.* **79**, 55-92 (2001).
- Ma, Y.; Visser, L.; Blokzijl, T.; Harms, G.; Atayar, C.; Poppema, S. & van den Berg, A. The CD4+CD26- T-cell population in classical Hodgkin's lymphoma displays a distinctive regulatory T-cell profile. *Lab. Invest.* **88 (5)**, 482-489 (2008).
- Macatonia, S.E.; Hosken, N.A.; Litton, M.; Vieira, P.; Hsieh, C.S.; Culpepper, J.A.; Wysocka, M.; Trinchieri, G.; Murphy, K.M. & O'Garra, A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1

- cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* **154** (10), 5071-5079 (1995).
- Magee, A.I. & Parmryd, I. Detergent-resistant membranes and the protein composition of lipid rafts. *Genome Biol.* **4** (11), 234 (2003).
  - Magram, J.; Connaughton, S.E.; Warrier, R.R.; Carvajal, D.M.; Wu, C.Y.; Ferrante, J.; Stewart, C.; Sarmiento, U.; Faherty, D.A. & Gately M.K. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* **4** (5), 471-481 (1996).
  - Majeti, R.; Xu, Z.; Parslow, T.G.; Olson, J.L.; Daikh, D.I.; Killeen, N. & Weiss, A. An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell.* **103** (7), 1059-1070 (2000).
  - Maloy, K.J.; Salaun, L.; Cahill, R.; Dougan, G.; Saunders, N.J. & Powrie, F. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* **197**(1), 111-119 (2003).
  - Mandapathil, M.; Hildofer, B.; Szczepanski, M.J.; Czystowska, M.; Szajnik, M.; Ren, J.; Lang, S.; Jackson, E.K.; Gorelik, E. & Whiteside, T.L. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FoxP3 regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* **285** (10), 7176-7186 (2010).
  - Manel, N.; Unutmaz, D. & Littman, D.R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat. Immunol.* **9** (6), 641-649 (2008).
  - Marguet, D.; Baggio, L.; Kobayashi, T.; Bernard, A.M.; Pierres, M.; Nielsen, P.F.; Ribet, U.; Watanabe, T.; Drucker, D.J. & Wagtmann N. Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97** (12), 6874-6879 (2000).

- Marmor, M.D. & Julius, M. Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Blood*. **98 (5)**, 1489-1497 (2001).
- Martin, M.; Centelles, J.J.; Huguet, J.; EchevRNAe, F.; Colomer, D.; Vives-Corróns, J.L. & Franco, R. Surface expression of adenosine deaminase in mitogen-stimulated lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **93 (2)**, 286-291 (1993).
- Martín, M.; Huguet, J.; Centelles, J.J. & Franco, R. Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. Possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. *J. Immunol.* **155 (10)**, 4630-4643 (1995).
- Matikainen, S.; Sareneva, T.; Ronni, T.; Lehtonen, A.; Koskinen, P.J. & Julkunen, I. Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells. *Blood*. **93 (6)**, 1980-1991 (1999).
- Matsuzaki, G. & Umemura, M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol. Immunol.* **51 (12)**, 1139-1147 (2007).
- Mattern, T.; Scholz, W.; Feller, A.C.; Flad, H.D. & Ulmer, A.J. Expression of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) on resting and activated human T-lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **33 (6)**, 737-748 (1991).
- Mattern, T.; Reich, C.; Duchrow, M.; Ansorge, S.; Ulmer, A.J. & Flad, H.D. Antibody-induced modulation of CD26 surface expression. *Immunology*. **84 (4)**, 595-600 (1995).
- McCaughan, G.W.; Wickson, J.E.; Creswick, P.F. & Gorrell, M.D. Identification of the bile canalicular cell surface molecule GP110 as the ectopeptidase dipeptidyl peptidase IV: an analysis by tissue distribution, purification and N-terminal amino acid sequence. *Hepatology*. **11**, 534-544 (1990).

## 6. Bibliografia

---

- McHugh, R.S.; Whitters, M.J.; Piccirillo, C.A.; Young, D.A.; Shevach, E.M.; Collins, M. & Byrne, M.C. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. **16** (2), 311-323 (2002).
- McNeill, L.; Salmond, R.J.; Cooper, J.C.; Carret, C.K.; Cassady-Cain, R.L.; Roche-Molina, M.; Tandon, P.; Holmes, N. & Alexander, D.R. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses. *Immunity*. **27** (3), 425-437 (2007).
- Medzhitov, R. & Janeway, C.A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9** (1), 4-9 (1997).
- Mehrotra, P.T.; Donnelly, R.P.; Wong, S.; Kanegane, H.; Geremew, A.; Mostowski, H.S.; Furuke, K.; Siegel, J.P. & Bloom, E.T. Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J. Immunol.* **160** (6), 2637-2644 (1998).
- Melkerson-Watson, L.J.; Waldmann, M.E.; Gunter, A.D.; Zaroukian, M.H. & Esselman, W.J. Elevation of lymphocyte CD45 protein tyrosine phosphatase activity during mitosis. *J. Immunol.* **153** (5), 2004-2013 (1994).
- Melkonian, K.A.; Ostermeyer, A.G.; Chen, J.Z.; Roth, M.G. & Brown, D.A. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. *J. Biol.Chem.* **274** (6), 3910-3917 (1999).
- Middleton, D.; Curran, M. & Maxwell, L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl. Immunol.* **10** (2-3), 147-164 (2002).
- Minami, Y.; Stafford, F.J.; Lippincott-Schwartz, J.; Yuan, L.C. & Klausner, R.D. Novel redistribution of an intracellular pool of CD45 accompanies T cell activation. *J. Biol. Chem.* **266** (14), 9222-30 (1991).

- Mirabet, M.; Herrera, C.; Cordero, O.J.; Mallol, J.; Lluís, C. & Franco, R. Expression of A2B adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation. *J. Cell Sci.* **112** (4), 491-502 (1999).
- Miyajima, A.; Kitamura, T.; Harada, N.; Yokota, T. & Arai, K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 295-331 (1992).
- Mizokami, A.; Eguchi, K.; Kawakami, A.; Ida, H.; Kawabe, Y.; Tsukada, T.; Aoyagi, T.; Maeda, K.; Morimoto, C. & Nagataki, S. Increased population of high fluorescence 1F7 (CD26) antigen on T cells in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **23** (12), 2022-2026 (1996).
- Montixi, C.; Langlet, C.; Bernard, A.M.; Thimonier, J.; Dubois, C.; Wurbel, M.A.; Chauvin, J.P.; Pierres, M. & He, H.T. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* **17** (18), 5334-5348 (1998).
- Mosmann, T.R. & Coffman, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145-173 (1989).
- Mor, A. & Philips, M.R. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 771-800 (2006).
- Morimoto, C. & Schlossman, S.F. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol. Rev.* **161**, 55-70 (1998).
- Morinobu, A.; Gadina, M.; Strober, W.; Visconti, R.; Fornace, A.; Montagna, C.; Feldman, G.M.; Nishikomori, R. & O'Shea, J.J. STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN-gamma production but not for cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99** (19), 12281-12286 (2002).
- Morishima, N.; Mizoguchi, I.; Takeda, K.; Mizuguchi, J. & Yoshimoto, T. TGF-beta is necessary for induction of IL-23R and Th17

- differentiation by IL-6 and IL-23. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386** (1), 105-110 (2009).
- Morrison, M.E.; Vijayasaradhi, S.; Engelsteins, D; Albino, A.P. & Houghton, A.N. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J. Exp. Med.* **177**, 1135-1143 (1993).
  - Murakami, M.; Sakamoto, A.; Bender, J.; Kappler, J. & Marrack, P. CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99** (13), 8832-8837 (2002).
  - Murphy, L.O. & Blenis, J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends. Biochem. Sci.* **31** (5), 268-275 (2006).N
  - Nauck, M.A.; Vilsbøll, T.; Gallwitz, B.; Garber, A. & Madsbad, S. Incretin-based therapies: viewpoints on the way to consensus. *Diabetes Care.* **32** (suppl. 2), S223-S231(2009).
  - Neel, N.F.; Schutyser, E.; Sai, J.; Fan, G.H. & Richmond, A. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16** (6), 637-658 (2005).
  - Nelson, P.J. & Daniel, T.O. Emerging targets: molecular mechanisms of cell contact-mediated growth control. *Kidney Int.* **61** (1), S99-105 (2002).
  - Neubauer, H.; Cumano, A.; Müller, M.; Wu, H.; Huffstadt, U. & Pfeffer, K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell.* **93** (3), 397-409 (1998).
  - Nguyen, D.H. & Hildreth, J.E. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J. Virol.* **74** (7), 3264-3272 (2000).
  - Nguyen, K.B.; Watford, W.T.; Salomon, R.; Hofmann, S.R.; Pien, G.C., Morinobu, A.; Gadina, M.; O'Shea, J.J. & Biron, C.A. Critical role for



- STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* **297** (5589), 2063-2066 (2002).
- Nichols, B.J.; Kenworthy, A.K.; Polishchuk, R.S.; Lodge, R.; Roberts, T.H.; Hirschberg, K.; Phair, R.D. & Lippincott-Schwartz, J. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell. Biol.* **153** (3), 529-541 (2001).
  - Niedbala, W.; Wei, X.Q.; Cai, B.; Hueber, A.J.; Leung, B.P.; McInnes, I.B. & Liew, F.Y. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* **37** (11), 3021-3029 (2007).
  - Noble, A.; Thomas, M.J. & Kemeny, D.M. Early Th1/Th2 cell polarization in the absence of IL-4 and IL-12: T cell receptor signaling regulates the response to cytokines in CD4 and CD8 T cells. *Eur. J. Immunol.* **31** (7), 2227-2235 (2001).
  - Norton, A.J.; Ramsay, A.D.; Smith, S.H.; Beverly, P.C. & Isaacson, P.G. Monoclonal antibody (UCHL1) that recognizes normal and neoplastic T cells in routinely fixed tissues. *J Clin. Pathol.* **39**, 399-405 (1986).
  - Nowak, E.C.; Weaver, C.T.; Turner, H.; Begum-Haque, S.; Becher, B.; Schreiner, B.; Coyle, A.J.; Kasper, L.H. & Noelle, R.J. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J. Exp. Med.* **206** (8), 1653-1660 (2009).
  - Nunès, J.A.; Truneh, A.; Olive, D. & Cantrell D.A. Signal transduction by CD28 costimulatory receptor on T cells. B7-1 and B7-2 regulation of tyrosine kinase adaptor molecules. *J. Biol. Chem.* **271** (3), 1591-1598 (1996).
  - O'Shea, J.J. & Murray, P.J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity.* **28** (4), 477-487 (2008).

## 6. Bibliografia

---

- O'Shea, J.J. & Paul, W.E. Regulation of T(H)1 differentiation-controlling the controllers. *Nat. Immunol.* **3**, 141-152 (2002).
- O'Shea, J.J. & Paul, W.E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* **327** (5969), 1098-1102 (2010).
- Oh, S.; Rankin, A.L. & Caton, A.J. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in autoimmune arthritis. *Immunol. Rev.* **233** (1), 97-111 (2010).
- Ohnuma, K.; Yamochi, T.; Uchiyama, M.; Nishibashi, K.; Yoshikawa, N.; Shimizu, N.; Iwata, S.; Tanaka, H.; Dang, N.H. & Morimoto, C. CD26 up-regulates expression of CD86 on antigen-presenting cells by means of caveolin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (39), 14186-14191 (2004).
- Ohnuma, K.; Dang, N.H. & Morimoto, C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends. Immunol.* **29** (6), 295-301 (2008).
- Ohnuma, K.; Uchiyama, M.; Hatano, R.; Takasawa, W.; Endo, Y.; Dang, N.H. & Morimoto, C. Blockade of CD26-mediated T cell costimulation with soluble caveolin-1-Ig fusion protein induces anergy in CD4<sup>+</sup>T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386** (2), 327-332 (2009).
- Ohtsuki, T.; Tsuda, H. & Morimoto, C. Good or evil: CD26 and HIV infection. *J. Dermatol. Sci.* **22** (3), 152-160 (2000).
- Okamura, H.; Kashiwamura, S.; Tsutsui, H.; Yoshimoto, T. & Nakanishi, K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr. Opin. Immunol.* **10** (3), 259-264 (1998).
- Oldenhove, G.; de Heusch, M.; Urbain-Vansanten, G.; Urbain, J.; Maliszewski, C.; Leo, O. & Moser, M. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* **198** (2), 259-266 (2003).

- Oppmann, B.; Lesley, R.; Blom, B.; Timans, J.C.; Xu, Y.; Hunte, B.; Vega, F.; Yu, N.; Wang, J.; Singh, K.; Zonin, F.; Vaisberg, E.; Churakova, T.; Liu, M.; Gorman, D.; Wagner, J.; Zurawski, S.; Liu, Y.; Abrams, J.S.; Moore, K.W.; Rennick, D.; de Waal-Malefyt, R.; Hannum, C.; Bazan, J.F. & Kastelein, R.A. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13** (5), 715-725 (2000).
- Pacheco, R.; Martinez-Navio, J.M.; Lejeune, M.; Climent, N.; Oliva, H.; Gatell, J.M.; Gallart, T.; Mallol, J.; Lluís, C. & Franco, R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102** (27), 9583-9538 (2005).
- Pancer, Z. & Cooper, M.D. The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 497-518 (2006).
- Parham, C.; Chirica, M.; Timans, J.; Vaisberg, E.; Travis, M.; Cheung, J.; Pflanz, S.; Zhang, R.; Singh, K.P.; Vega, F.; To, W.; Wagner, J.; O'Farrell, A.M.; McClanahan, T.; Zurawski, S.; Hannum, C.; Gorman, D.; Rennick, D.M.; Kastelein, R.A.; de Waal Malefyt, R. & Moore, K.W. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.* **168** (11), 5699-5708 (2002).
- Parikh, K.; Poppema, S.; Peppelenbosch, M.P. & Visser, L. Extracellular ligation-dependent CD45RB enzymatic activity negatively regulates lipid raft signal transduction. *Blood*. **113** (3), 594-603 (2009).
- Park, H.; Li, Z.; Yang, X.O.; Chang, S.H.; Nurieva, R.; Wang, Y.H.; Wang, Y.; Hood, L.; Zhu, Z.; Tian, Q. & Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* **6** (11), 1133-1141 (2005).

## 6. Bibliografia

---

- Parolini, I.; Sargiacomo, M.; Lisanti, M.P. & Peschle, C. Signal transduction and glycoposphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes. *Blood*. **87 (9)**, 3783-3794 (1996).
- Pearson, G.; Robinson, F.; Beers Gibson, T.; Xu, B.E.; Karandikar, M.; Berman, K. & Cobb, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22 (2)**, 153-183 (2001).
- Penninger, J.M.; Irie-Sasaki, J.; Sasaki, T. & Oliveira-dos-Santos, A.J. CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat. Immunol.* **2 (5)**, 389-396 (2001).
- Perussia, B.; Chan, S.H.; D'Andrea, A.; Tsuji, K.; Santoli, D.; Pospisil, M.; Young, D.; Wolf, S.F. & Trinchieri, G. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. *J. Immunol.* **149 (11)**, 3495-3502 (1992).
- Pestka, S.; Krause, C.D.; Sarkar, D.; Walter, M.R.; Shi, Y. & Fisher, P.B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 929-979 (2004).
- Piccirillo, C.A. & Shevach, E.M. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol.* **167 (3)**, 1137-1140 (2003).
- Picker, L.J. Regulation of tissue-selective T-lymphocyte homing receptors during the virgin to memory/effector cell transition in human secondary lymphoid tissues. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148 (6)**, S47-S54 (1993).
- Pignata, C.; Prasad, K.V.; Hallek, M.; Druker, B.; Rudd, C.E.; Robertson, M.J. & Ritz, J. Phosphorylation of src family lck tyrosine

- kinase following interleukin-12 activation of human natural killer cells. *Cell. Immunol.* **165** (2), 211-216 (1995).
- Pike, L.J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655-667 (2003).
  - Pingel, J.T. & Thomas, M.L. Evidence that leukocyte-common antigen is required for antigen induced T lymphocyte proliferation. *Cell* **58**, 1055-1065 (1989).
  - Pflanz, S.; Timans, J.C.; Cheung, J.; Rosales, R.; Kanzler, H.; Gilbert, J.; Hibbert, L.; Churakova, T.; Travis, M.; Vaisberg, E.; Blumenschein, W.M.; Mattson, J.D.; Wagner, J.L.; To, W.; Zurawski, S.; McClanahan, T.K.; Gorman, D.M.; Bazan, J.F.; de Waal Malefyt, R.; Rennick, D. & Kastelein, R.A. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity*, **16** (6), 779-790 (2002).
  - Podlaski, F.J.; Nanduri, V.B.; Hulmes, J.D.; Pan, Y.C.; Levin, W.; Danho, W.; Chizzonite, R.; Gately, M.K. & Stern, A.S. Molecular characterization of interleukin 12. *Arch. Biochem. Biophys.* **294** (1), 230-237 (1992).
  - Preller, V.; Gerber, A.; Wrenger, S.; Togni, M.; Marguet, D.; Tadge, J.; Lendeckel, U.; Röcken, C.; Faust, J.; Neubert, K.; Schraven, B.; Martin, R.; Ansorge, S.; Brocke, S. & Reinhold, D. TGF-beta1-mediated control of central nervous system inflammation and autoimmunity through the inhibitory receptor CD26. *J. Immunol.* **178** (7), 4632-4640 (2007).
  - Presky, D.H.; Yang, H.; Minetti, L.J.; Chua, A.O.; Nabavi, N.; Wu, C.Y.; Gately, M.K. & Gubler, U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93** (24), 14002-14007 (1996).

## 6. Bibliografia

---

- Qian, D. & Weiss, A. T cell antigen receptor signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** (2), 205-212 (1997).
- Quah, B.J.; Warren, H.S. & Parish, C.R. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat. Protoc.* **2** (9), 2049-2056 (2007).
- Quinn, P.J. A lipid matrix model of membrane raft structure. *Prog. Lipid. Res.* doi: 10.1016/j.plipres.2010.05.002 (2010).
- Rana, T.M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** (1), 23-36 (2007).
- Ravetch, J.V. & Clynes, R.A. Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 421-432 (1998).
- Razzaq, T.M.; Ozegbe, P.; Jury, E.C.; Sembi, P.; Blackwell, N.M. & Kabouridis, P.S. Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology.* **113**, 413-426 (2004).
- Read, S.; Malmstrom, V. & Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **192**, 295-302 (2000).
- Reinhold, D.; Bank, U.; Bühling, F.; Lendeckel, U.; Faust, J.; Neubert, K. & Ansorge, S. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor-beta 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology* **91** (3), 354-360 (1997).
- Rodgers, W. & Rose, J.K. Exclusion of Cd45 inhibits activity of P56 (lck) associated with glycolipid-enriched membrane domains. *J. Cell. Biol.* **135**, 1515-1523 (1996).
- Rogge, L.; Barberis-Maino, L.; Biffi, M.; Passini, N.; Presky, D.H.; Gubler, U. & Sinigaglia, F. Selective expression of an interleukin-12

- p>receptor component by human T helper 1 cells.
- J. Exp. Med.*
- 185**
- (5), 825-831 (1997).
- Ruers, T.J.; Buurman, W.A. & van der Linden, C.J. 2'Deoxycoformycin and deoxyadenosine affect IL 2 production and IL 2 receptor expression of human T cells. *J. Immunol.* **138** (1), 116-122 (1987).
  - Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155** (3), 1151-1164 (1995).
  - Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6** (4), 345-352 (2005).
  - Salgado, F.J.; Vela, E.; Martín, M.; Franco, R.; Nogueira, M. & Cordero, O.J. Mechanisms of CD26/Dipeptidyl peptidase IV cytokine-dependent regulation on human activated lymphocytes. *Cytokine* **12** (7), 1136-1141 (2000).
  - Salgado, F.J.; Lojo, J.; Fernández-Alonso, C.M.; Viñuela, J.E.; Cordero, O.J. & Nogueira, M. Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated cells. *Immunol. Cell Biol.* **80** (2),138-47 (2002)
  - Salgado, F.J.; Lojo, J.; Alonso-Lebrero, J.L.; Lluís, C.; Franco. R.; Cordero, O.J. & Nogueira, M. A role for interleukin-12 in the regulation of T cell plasma membrane compartmentation. *J. Biol. Chem.* **278** (27), 24849-24857 (2003).
  - Salgado, F.J.; Piñeiro, A.; Canda-Sánchez, A.; Lojo, J. & Nogueira, M. Prothymosin alpha-receptor associates with lipid rafts in PHA-stimulated lymphocytes. *Mol. Membr. Biol.* **22**(3),163-176 (2005).

- Sanchez, J.; Casaño, J.; Alvarez, M.A.; Roman-Gomez, J.; Martin, C.; Martinez, F.; Gomez, P.; Serrano, J.; Herrera, C. & Torres, A. Kinetic of regulatory CD25<sup>high</sup> and activated CD134<sup>+</sup> (OX40) T lymphocytes during acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.* **126**, 697-703 (2004).
- Sarris, M.; Andersen, K.G.; Randow, F.; Mayr, L. & Betz, A.G. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity.* **28**, 402-413 (2008).
- Sasaki, T.; Sasaki-Irie, J. & Penninger, J.M. New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **33 (11)**, 1041-1046 (2001).
- Sato, T.; Yamochi, T.; Yamochi, T.; Aytac, U.; Ohnuma, K.; McKee, K.S.; Morimoto, C. & Dang N.H. CD26 regulates p38 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of integrin  $\beta_1$ , adhesion to extracellular matrix, and tumorigenicity of T-anaplastic large cell lymphoma Karpas 299. *Cancer Res.* **65 (15)**, 6950-6956 (2005).
- Saunders, A.E. & Johnson, P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cell. Signal.* **22 (3)**, 339-348 (2010).
- Seddiki, N.; Santner-Nanan, B.; Martinson, J.; Zaunders, J.; Sasson, S.; Landay, A.; Solomon, M.; Selby, W.; Alexander, S.I.; Nanan, R.; Kelleher, A. & Fazekas de St Groth, B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* **203 (7)**, 1693-1700 (2006).
- Shaw, A.S. & Dustin, M.L. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* **6 (4)**, 361-369 (1997).



- Shu, U.; Kiniwa, M.; Wu, C.Y.; Maliszewski, C.; Vezzio, N.; Hakimi, J.; Gately M. & Delespesse, G. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur. J. Immunol.* **25** (4), 1125-1128 (1995).
- Sieburth, D.; Jabs, E.W.; Warrington, J.A.; Li, X.; Lasota, J.; LaForgia, S.; Kelleher, K.; Huebner, K.; Wasmuth, J.J. & Wolf, S.F. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics.* **14** (1), 59-62 (1992).
- Shimizu, J.; Yamakazi, S.; Takahashi, T.; Ishida, Y. & Sakaguchi, S. Stimulation of CD25+ CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* **3**, 135-142 (2002).
- Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572 (1997).
- Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1** (1), 31-39 (2000).
- Singer, S.J. & Nicholson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* **175**, 720-731 (1972).
- Smith, J.W.; Steiner, A.L.; Newberry, W.M. Jr. & Parker, C.W. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in human lymphocytes. Alterations after phytohemagglutinin stimulation. *J. Clin. Invest.* **50** (2), 432-441 (1971).
- Smith, S.; Brown, M.; Rowe, D.; Callard, R. & Beverly, P.C. Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL-1. *Immunology.* **58**, 63-70 (1986).
- Snijders, A.; Hilkens, C.M.; van der Pouw Kraan, T.C.; Engel, M.; Aarden, L.A. & Kapsenberg, M.L. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is

- determined by the expression of the p35 subunit. *J. Immunol.* **156** (3), 1207-1212 (1996).
- Sperling, A.I.; Sedy, J.R.; Manjunath, N.; Kupfer, A.; Ardman, B. & Burkhardt, J.K. TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *J. Immunol.* **161** (12), 6459-6462 (1998).
  - Sprent, J. T and B memory cells. *Cell.* **76** (2), 315-322 (1994).
  - Steeg, C.; Hartwig, U. & Fleischer, B. Unchanged signaling capacity of mutant CD26/dipeptidylpeptidase IV molecules devoid of enzymatic activity. *Cell. Immunol.* **164**, 311-315 (1995).
  - Swain, S.L.; Weinberg, A.D.; English, M. & Huston, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* **145** (11), 3796-3806 (1990).
  - Szabo, S.J.; Dighe, A.; Gubler, U. & Murphy, K.M. Regulation of the interleukin (IL)-12R  $\beta$ 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J. Exp. Med.* **185** (5), 817-824 (1997).
  - Takahashi, T.; Kuniyasu, Y.; Toda, M.; Sakaguchi, N.; Itoh, M.; Iwata, M.; Shimizu, J. & Sakaguchi, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* **10** (12), 1969-1980 (1998).
  - Takenaka, H.; Maruo, S.; Yamamoto, N.; Wysocka, M.; Ono, S.; Kobayashi, M.; Yagita, H.; Okumura, K.; Hamaoka, T.; Trinchieri, G. & Fujiwara, H. Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4. *J. Leukoc. Biol.* **61** (1), 80-87 (1997).
  - Tanaka, T.; Kameoka, J.; Yaron, A.; Schlossman, S.F. & Morimoto, C. The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl

- peptidase IV enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90** (10), 4586-4590 (1993).
- Thierfelder, W.E.; van Deursen, J.M.; Yamamoto, K.; Tripp, R.A.; Sarawar, S.R; Carson, R.T.; Sangster, M.Y.; Vignali, D.A.; Doherty, P.C.; Grosveld, G.C. & Ihle, J.N. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*. **382** (6587), 171-174 (1996).
  - Thieu, V.T.; Yu, Q.; Chang, H.C.; Yeh, N.; Nguyen, E.T.; Sehra, S.; Kaplan, M.H. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity*. **29** (5), 679-690 (2008).
  - Thomas, M.L. The leukocyte common antigen family. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 339-369 (1989).
  - Thomas, M.L. & Brown, E.J. Positive and negative regulation fo Src-family membrane kinases by CD45. *Immunol. Today*. **20**, 406-411 (1999).
  - Thornton, A.M. & Shevach, E.M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **188** (2), 287-296 (1998).
  - Torimoto, Y.; Dang, N.H.; Vivier, E.; Tanaka, T.; Schlossman, S.F. & Morimoto, C. Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **147** (8), 2514-2517 (1991).
  - Torimoto, Y.; Dang, N.H.; Tanaka, T.; Prado, C.; Schlossman, S.F. & Morimoto, C. Biochemical characterization of CD26 (dipeptidyl peptidase IV): functional comparison of distinct epitopes recognized by various anti-CD26 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* **29** (2), 183-192 (1992).

## 6. Bibliografia

---

- Tosello, V.; Odunsi, K.; Souleimanian, N.E.; Lele, S.; Shrikant, P.; Old, L.J.; Valmori, D. & Ayyoub, M. Differential expression of CCR7 defines two distinct subsets of human memory CD4+CD25+ T regs. *Clin. Immunol.* **126**, 291-302 (2008).
- Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptative immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3** (2),133-46 (2003).
- Trinchieri, G.; Pflanz, S. & Kastelein, R.A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* **19** (5), 641-614 (2003).
- Vámosi, G.; Bodnár, A.; Vereb, G.; Jenei, A.; Goldman, C.K.; Langowski, J.; Tóth, K.; Mátyus, L.; Szöllösi, J.; Waldmann, T.A. & Damjanovich, S. IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101** (30), 11082-11087 (2004).
- Van der Weyden, M.B. & Kelley, W.N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. *J. Biol. Chem.* **251** (18), 5448-5456 (1976).
- Vanham, G.; Kestens, L.; De Meester, I.; Vingerhoets, J.; Penne, G.; Vanhoof, G.; Scharpé, S.; Heyligen, H.; Bosmans, E. & Ceuppens, J.L. Decreased expression of the memory marker CD26 on both CD4+ and CD8+ T lymphocytes of HIV-infected subjects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **6** (7), 749-757 (1993).
- Venken, K.; Hellings, N.; Broekmans, T.; Hensen, K.; Rummens, J.L. & Stinissen, P. Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J. Immunol.* **180** (9), 6411-6420 (2008).
- Venken, K.; Hellings, N.; Liblau, R. & Stinissen, P. Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends. Mol. Med.* **16** (2), 58-68 (2010).

- Vieira, P.L.; Christensen, J.R.; Minaee, S.; O'Neill, E.J.; Barrat, F.J.; Boonstra, A.; Barthlott, T.; Stockinger, B.; Wraith, D.C. & O'Garra, A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **172** (10), 5986-5993 (2004).
- Volarevic, S.; Niklinska, B.B.; Burns, C.M.; June, C.H.; Weissman, A.M. & Ashwell, J.D. Regulation of TCR signaling by CD45 lacking transmembrane and extracellular domains. *Science.* **260**, 544-544 (1993).
- von Boehmer, H. & Melchers, F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat. Immunol.* **11** (1), 14-20 (2010).
- von Bonin, A.; Hühn, J. & Fleischer, B. Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway. *Immunol. Rev.* **161**, 43-53 (1998).
- Walker, M.R.; Kasprowicz, D.J.; Gersuk, V.H.; Benard, A.; Van Landeghen, M.; Buckner, J.H. & Ziegler, S.F. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J. Clin. Invest.* **112** (9), 1437-1443 (2003).
- Wallach, D.; Varfolomeev, E.E.; Malinin, N.L.; Goltsev, Y.V.; Kovalenko, A.V. & Boldin, M.P. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 331-367 (1999).
- Watford, W.T.; Hissong, B.D.; Bream, J.H.; Kanno, Y.; Muul, L. & O'Shea, J.J. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol. Rev.* **202**, 139-156 (2001).
- Watford, W.T.; Moriguchi, M.; Morinobu, A. & O'Shea J.J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14** (5), 361-368 (2003).

## 6. Bibliografia

---

- Weiner, H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* **182**, 207-214 (2001).
- Weiss, J.M.; Subleski, J.J.; Wigginton, J.M. & Wilttrout, R.H. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **7 (11)**, 1705-1721 (2007).
- Welham, M.J.; Duronio, V.; Sanghera, J.S.; Pelech, S.L. & Schrader, J.W. Multiple hemopoietic growth factors stimulate activation of mitogen-activated protein kinase family members. *J. Immunol.* **149 (5)**, 1683-1693 (1992).
- Willheim, M.; Ebner, C.; Baier, K.; Kern, W.; Schratlbauer, K.; Thien, R.; Kraft, D.; Breiteneder, H.; Reinisch, W. & Scheiner, O. Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100 (3)**, 348-355 (1997).
- Wong, N.K.; Lai, J.C.; Birkenhead, D.; Shaw, A.S. & Johnson, P. CD45 down-regulates Lck-mediated CD44 signaling and modulates actin rearrangement in T cells. *J. Immunol.* **181 (10)**, 7033-7043 (2008).
- Wood, K.J. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 199-210 (2003).
- Workman, C.J.; Szymczak-Workman, A.L.; Collison, L.W.; Pillai, M.R. & Vignali, D.A. The development and function of regulatory T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **66 (16)**, 2603-2622 (2009).
- Xavier, R.; Brennan, T.; Li, Q.; McCormack, C & Seed, B. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity.* **8 (6)**, 723-732 (1998).
- Xu, Z. & Weiss, A. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat. Immunol.* **3 (8)**, 764-771 (2002).

- Yamagiwa, S.; Gray, J.D.; Hashimoto, S. & Horwitz, D.A. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J. Immunol.* **166**, 7282-7289 (2001).
- Yamamoto, K.; Yamaguchi, M.; Miyasaka, N. & Miura, O. SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor beta2 subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310 (4)**, 1188-1193 (2003).
- Yamazaki, S.; Iyoda, T.; Tarbell, K.; Olson, K.; Velinzon, K.; Inaba, K. & Steinman, R.M. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198 (2)**, 235-247 (2003).
- Yamochi, T.; Yamochi, T.; Aytac, U.; Sato, T.; Sato, K.; Ohnuma, K.; McKee, K.S.; Morimoto, C. & Dang N.H. Regulation of p38 phosphorylation and topoisomerase II $\alpha$  expression in the B-cell lymphoma line Jijoye by CD26/dipeptidyl peptidase IV is associated with enhanced *in vitro* and *in vivo* sensitivity to doxorubicin. *Cancer Res.* **65 (5)**, 1973-1983 (2005).
- Yazbeck, R.; Howarth, G.S. & Abbott, C.A. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends. Pharmacol. Sci.* **30 (11)**, 600-607 (2009).
- Yoo, J.K.; Cho, J.H.; Lee, S.W. & Sung, Y.C. IL-12 provides proliferation and survival signals to murine CD4+ T cells through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J. Immunol.* **169 (7)**, 3637-3643 (2002).
- Yu, D.; Rao, S.; Tsai, L.M.; Lee, S.K.; He, Y.; Sutcliffe, E.L.; Srivastava, M.; Linterman, M.; Zheng, L.; Simpson, N.; Ellyard, J.I.; Parish, I.A.; Ma, C.S.; Li, Q.J.; Parish, C.R.; Mackay, C.R. & Vinuesa,

- C.G. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity*. **31** (3), 457-468 (2009).
- Zeh, H.J. 3rd; Hurd, S.; Storkus, W.J. & Lotze, M.T. Interleukin-12 promotes the proliferation and cytolytic maturation of immune effectors: implications for the immunotherapy of cancer. *J. Immunother. Emphasis. Tumor. Immunol.* **14** (2), 155-161 (1993).
  - Zhang, M.; Moran, M.; Round, J.; Low, T.A.; Patel, V.P.; Tomassian, T.; Hernandez, J.D. & Miceli, M.C. CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK activation, synaptic raft clustering, and IL-2 production. *J. Immunol.* **174** (3), 1479-1490 (2005).
  - Zheng, W. & Flavell, R.A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. **89** (4), 587-596 (1997).
  - Zheng, S.G.; Wang, J. & Horwitz, D.A. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J. Immunol.* **180** (11), 7112-7116 (2008).
  - Zhou, L.; Lopes, J.E.; Chong, M.M.; Ivanov, I.I.; Min, R.; Victora, G.D.; Shen, Y.; Du, J.; Rubtsov, Y.P.; Rudensky, A.Y.; Ziegler, S.F. & Littman, D.R. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature*. **453** (7192), 236-240 (2008).
  - Zhu, J.; Yamane, H. & Paul, W.E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445-489 (2010).
  - Ziegler, S.F. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur. J. Immunol.* **37** (1), 21-23 (2007).
  - Zikherman, J.; Jenne, C.; Watson, S.; Doan, K.; Raschke, W.; Goodnow, C.C. & Weiss, A. CD45-Csk phosphatase-kinase titration



- uncouples basal and inducible T cell receptor signaling during thymic development. *Immunity*. **32 (3)**, 342-354 (2010).
- Zou, J.; Presky, D.H.; Wu, C.Y. & Gubler, U. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *J. Biol. Chem.* **272 (9)**, 6073-6077 (1997).



## IL-12-dependent activation of ERK1/2 in human T lymphoblasts

Ana Canda-Sánchez, Francisco J. Salgado, Amparo Pérez-Díaz, Carla Varela-González, Pilar Arias, Montserrat Nogueira\*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, CIBUS, University of Santiago de Compostela, C/Lope Gómez de Marzoa s/n, 15782 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

Received 1 April 2008; received in revised form 7 July 2008; accepted 17 July 2008

### Abstract

According to some authors, membrane compartmentalization is a key regulator of CD45 function. Indeed, it has been described that CD45 repositioning from raft microdomains to phospholipid-rich plasma membrane areas leads to the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs). We have previously shown that interleukin-12 (IL-12) increases the expression of CD26, promoting the interaction of CD26 with CD45R0 (a CD45 isoform) and removing CD45R0 from lipid rafts. Thus, this IL-12-dependent removal of CD45R0 from rafts could, hypothetically, fulfill functions like the activation of the ERK1/2 pathway. IL-12 is an important interleukin for T cells. Upon interaction with its receptor (interleukin-12 receptor; IL-12R), this cytokine triggers a signalling cascade, where the classical *Janus* kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway and other additional routes participate. Due to the promitogenic effect of IL-12 and the influence of this cytokine on CD45R0 compartmentalization, ERK kinases were likely candidates to be downstream of IL-12R. However, several research groups have rejected a role for these kinases. Now, results in this paper show that the IL-12R binding, similar to the stimulation via T cell receptor (TCR), promotes the activation of the Raf/MEK-1/ERK1/2 pathway. In addition, the IL-12R-associated *Janus* kinase JAK2, but not TYK2, seems upstream of this important pathway for the proliferation of human T cells. However, even though c-Myc is slightly up-regulated by IL-12 and partially mediates the proliferative effect of IL-12, this transcription factor was not found downstream of ERK1/2.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** c-Myc; ERK1/2; IL-12; JAK2; TYK2

**Abbreviations:** APC, antigen presenting cell; CBA, cytometric bead array; CFSE, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; ERK, extracellular signal-regulated kinase; IL-12, interleukin-12; IL-12R, interleukin-12 receptor; JAK, *Janus* kinase; JNK, Jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PFA, paraformaldehyde; PHA, phytohemagglutinin; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PMA, phorbol 12-myristate-13-acetate; STAT, signal transducers and activators of transcription; TCR, T cell receptor.

\*Corresponding author. Tel.: +34 981 563100x16936; fax: +34 981 596904.

E-mail address: [bnlmna@usc.es](mailto:bnlmna@usc.es) (M. Nogueira).

### Introduction

CD4<sup>+</sup> T cells are a heterogeneous population made of various lymphocyte subsets, each one secreting a differentiated profile of cytokines. Thus, T<sub>H1</sub> cells produce TNF- $\alpha$ /IFN $\gamma$  and are involved in cell-mediated responses, while T<sub>H2</sub> lymphocytes rather orchestrate the humoral branch of the immune system by way of production of cytokines such as IL-4/IL-5 (Szabo et al., 2003). Interleukin-12 (IL-12) is a key cytokine secreted

by antigen-presenting cells (APCs) and important in T cell proliferation,  $\text{IFN}\gamma$  production and  $\text{T}_{\text{H}1}$  cell differentiation (Trinchieri, 2003). The functional receptor for IL-12 (IL-12R) is made of two subunits, IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2. Both chains, separately, recognize IL-12 with low affinity, but upon ligand-induced dimerization a high-affinity heterodimeric receptor arises. IL-12R $\beta$ 1 is constitutively expressed by T cells, but also up-regulated upon activation, while resting T cells lack IL-12R $\beta$ 2 and require T cell receptor (TCR) stimulation to express this protein (Watford et al., 2004).

IL-12R does not exhibit enzymatic activity but is associated with both TYK2 (IL-12R $\beta$ 1-linked) and *Janus* kinase 2 (JAK2) (IL-12R $\beta$ 2-bound), two members of the *Janus* family of intracellular non-receptor tyrosine kinases (JAKs). Upon IL-12R ligation, these kinases phosphorylate tyrosine residues on IL-12R $\beta$ 2 (Watford et al., 2004) and, at least in the murine system, they seem linked to specific functions:  $\text{IFN}\gamma$  production (TYK2) and cell proliferation (JAK2) (Sugimoto et al., 2003). However, because of the differences between murine and human IL-12 receptors (Watford et al., 2004), this issue still remains to be tested for human T cells.

Upon IL-12 binding, tyrosine phosphorylation of the IL-12R $\beta$ 2 cytoplasmic domain provides docking sites for proteins of the signal transducers and activators of transcription (STATs) family. STAT4 is the main member used by IL-12, but others like STAT1, STAT3 or STAT5 have been also described (Watford et al., 2004). STAT4 is tyrosine-phosphorylated by JAKs and translocated into the nucleus, where a serine is phosphorylated by a mitogen-activated protein kinase (MAPK-p38) (Watford et al., 2004). Both STAT4 and its double tyrosine/serine phosphorylation are important for  $\text{IFN}\gamma$  production and  $\text{T}_{\text{H}1}$  differentiation. However, STAT4 contribution to cell proliferation is controversial (Watford et al., 2004) and some authors attribute the mitogenic function of IL-12 to kinases like JAK2 (Sugimoto et al., 2003) or phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt (Yoo et al., 2002), as well as to transcription factors like STAT5 or c-Myc (Sugimoto et al., 2003).

IL-12 modulates the expression of molecules like CD26 or CD45R0 (Cordero et al., 1997, 1998), but also controls their segregation in different membrane areas: e.g. CD45R0, a CD45 isoform, relocates from lipid rafts to phospholipid-rich areas of the plasma membrane upon T cell activation, especially when lymphocytes are co-stimulated with IL-12 (Zhang et al., 2005; Salgado et al., 2003). According to our hypothesis, CD45R0 segregation in response to IL-12 could be important for activation of MAPKs (Zhang et al., 2005), a group of enzymes (extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 kinase) whose activation is controlled by different stimuli. In this sense,

it was described that IL-12 causes an increase of the tyrosine phosphorylation of a 44 kDa MAPK in human PHA lymphoblasts (Pignata et al., 1994). Much more recently, however, some authors have rejected a role for ERKs (and also JNKs) as mediators of the IL-12 functions (Athie et al., 2000; Visconti et al., 2000), which leaves an open question: are ERKs really involved in the mechanism through which IL-12 promotes T cell proliferation?

## Material and methods

### Materials

Phytohaemagglutinin (PHA), carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA), paraformaldehyde (PFA), dimethyl sulfoxide (DMSO), penicillin/streptomycin solution, RPMI-1640, human IgG, orthovanadate and mouse anti- $\beta$ -actin mAb were obtained from Sigma, and rhIL-12 from Peprotech. Tyrphostins A1 (AG9) and B42 (AG490) and both (3-(2-aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl)methylene)-2,4-thiazolidinedione; ERKi) and ((Z,E)-5-(4-Ethylbenzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one; c-Myc) inhibitors were purchased from Calbiochem. GE provided us with Ficoll Paque<sup>TM</sup> Plus, ECL<sup>Plus</sup> and Western Blotting detection kits, while the Super RX film was from Fujifilm, the PVDF membrane from Millipore and the goat anti-mouse H+L from Caltag. The Phospho-ERK1/2 Pathway Sampler Kit, with antibodies to phospho-Raf (Ser-259), phospho-MEK1/2 (Ser-217/Ser-221), phospho-ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204), phospho-Elk-1 (Ser-383) and phospho-p90RSK (Ser-380), was purchased from Cell Signalling. Anti-phospho-Tyr mAb (clone PY20), biotinylated polyclonal goat anti-rat Ig, Phospho-Flow Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 conjugated anti-phospho-ERK1/2 and both rat anti-human IL-12R $\beta$ 1 (clone 2B10) and rat anti-human IL-12R $\beta$ 2 (clone 2B6) (with their corresponding isotypes), as well as capture and detection reagents (PE-labelled) used in cytometric bead array (CBA)/Flex Set experiments to detect phospho-p38 (Thr-180/Tyr-182), phospho-ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204) and phospho-JNK1/2 (Thr-183/Tyr-185), were all from BD. Streptavidin-PE and anti-c-Myc (clone 9E10) were obtained from Serotec, and BCA from Pierce.

### Cell isolation and culture

Blood, donated and processed by Centro de Transfusiones de Galicia (Santiago de Compostela, Spain), was provided as buffy coats. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from these buffy coats, cultured and activated with PHA to obtain

T cell lymphoblasts (>90% CD3<sup>+</sup> T cells) as previously (Cordero et al., 1997).

### Flow cytometric extracellular labelling

To detect the IL-12 receptor, PHA lymphoblasts (10 µg/ml PHA for 3 days;  $1 \times 10^6$  cells/sample) were washed, stimulated, fixed with ice-cold 1% (w/v) PFA in PBS pH 7.4 at RT for 5 min and washed again with PBS 1% (w/v) BSA 0.05% (w/v) NaN<sub>3</sub>. FcRs were blocked (30 min, 4 °C) with human IgG, and cells incubated (1 h, 4 °C) with the primary antibody (anti-IL-12Rβ1, anti-IL-12Rβ2 or the corresponding isotype). After washing, cells were sequentially incubated with biotinylated anti-rat Ig (1 h, 4 °C) and streptavidin-PE (1 h, 4 °C) and samples run on a FACScalibur<sup>®</sup> flow cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using WinMDI software.

### CFSE-based proliferation assays

PBMCs were placed in RPMI ( $10 \times 10^6$  cell/ml) and incubated with 5 µM CFSE for 8 min (RT) in the dark. Then, an equal volume of FBS was added and cells thoroughly washed before cell counting. Cultures were set up at  $0.25 \times 10^6$  cells/ml and 1.25 µg/ml PHA ( $\pm 2$  ng/ml IL-12), and CFSE fluorescence measured by flow cytometry after 5 days. Unlabelled cells served as negative controls.

### Intracellular phospho-ERK1/2 staining

To detect phospho-ERK,  $20 \times 10^6$  lymphoblasts (10 µg/ml PHA; 3 days) were placed in RPMI (supplemented or not with inhibitors as indicated) and anti-mouse H + L added. After 10 min at 37 °C, aliquots of  $6 \times 10^6$  cells were collected and fixed in PBS 4% (w/v) PFA (10 min, 37 °C) ( $T = 0$ ). Then, either anti-CD3 (OKT3 mAb), PMA (200 ng/ml) or IL-12 (2 ng/ml) were added for different times at 37 °C to the remaining cells and  $6 \times 10^6$  lymphoblast aliquots were collected and fixed. For labelling,  $1 \times 10^6$  cell samples were washed (PBS pH 7.4) and permeabilized with 90% (v/v) methanol (at –20 °C) for 30 min on ice. After washing (PBS 2% (v/v) FBS 0.05% (w/v) NaN<sub>3</sub>), FcRs were blocked and cells stained with anti-pERK1/2-Alexa 488 (1 h, RT).

### Cytometric bead array (CBA) experiments

Lymphoblasts (10 µg/ml PHA, 3 days) were placed in 4 tubes ( $1 \times 10^6$  cells/ml) for 5 min at 37 °C, and then stimulated with either PMA (200 ng/ml) or IL-12 (2 ng/ml) for an additional 5 min period at the same temperature. Cells were then washed (PBS pH 7.4,

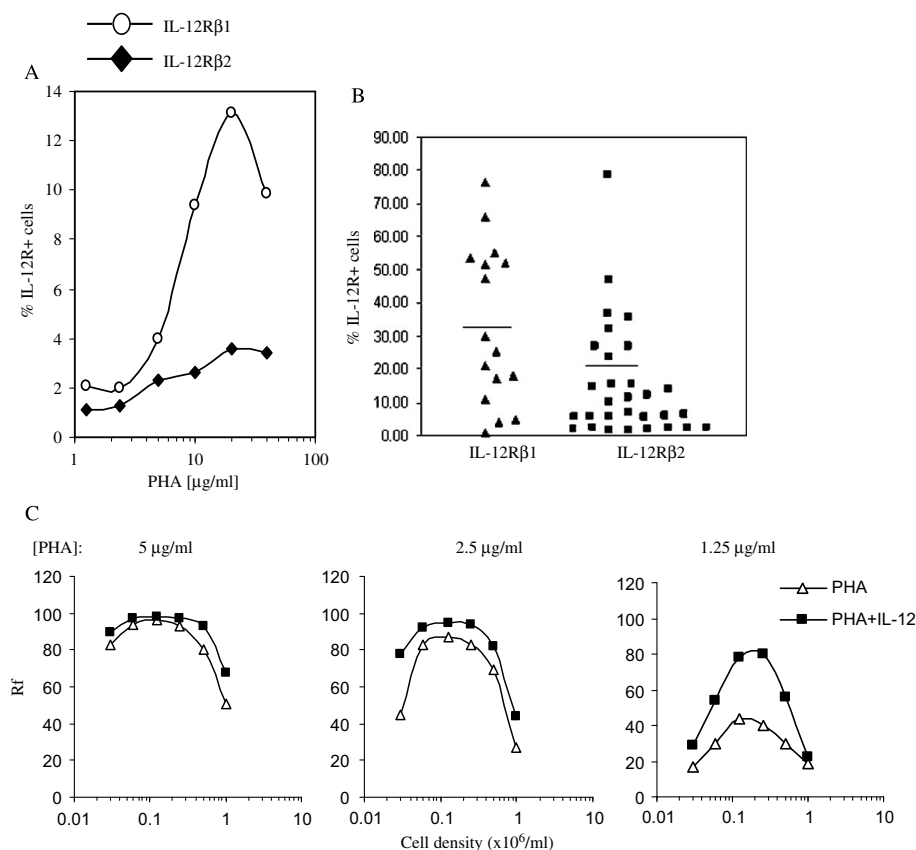
4 °C), supplemented with 1 mM orthovanadate, collected, lysated with the buffer provided with this kit, and their DNA disrupted with a syringe. Protein concentration in samples was quantified by BCA and equal amounts analyzed following the manufacturer's indications. Sample acquisition and data analysis were performed with a FACSCanto<sup>™</sup> flow cytometer and FCAP Array<sup>™</sup> software, both from BD Biosciences.

### SDS-PAGE and western blotting

To detect c-Myc and tyrosine phosphorylation, aliquots of  $1.5 \times 10^6$  lymphoblasts were lysed with  $2 \times$  SDS-PAGE sample buffer (final concentration: 200 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% v/v glycerol, 3% w/v β-mercaptoethanol and 0.1% (w/v) bromophenol blue). Samples were boiled (5 min) and proteins resolved on SDS-PAGE gels, transferred to PVDF and membranes blocked with 10% (w/v) semi-fat dry milk in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20) or, to detect tyrosine phosphorylation, 1% (w/v) BSA-TBS-T. Blots were incubated with primary antibodies in blocking buffer, washed (TBS-T) and HRP-conjugated secondary antibodies used. Detection was performed with ECL<sup>Plus</sup>. When necessary, antibodies were removed with 0.2 N NaOH (15 min, RT) before reprobing. Densitometric values were obtained using a ScanMaker 9800XL calibrated scanner (Microtek) and Quantity One software (BioRad).

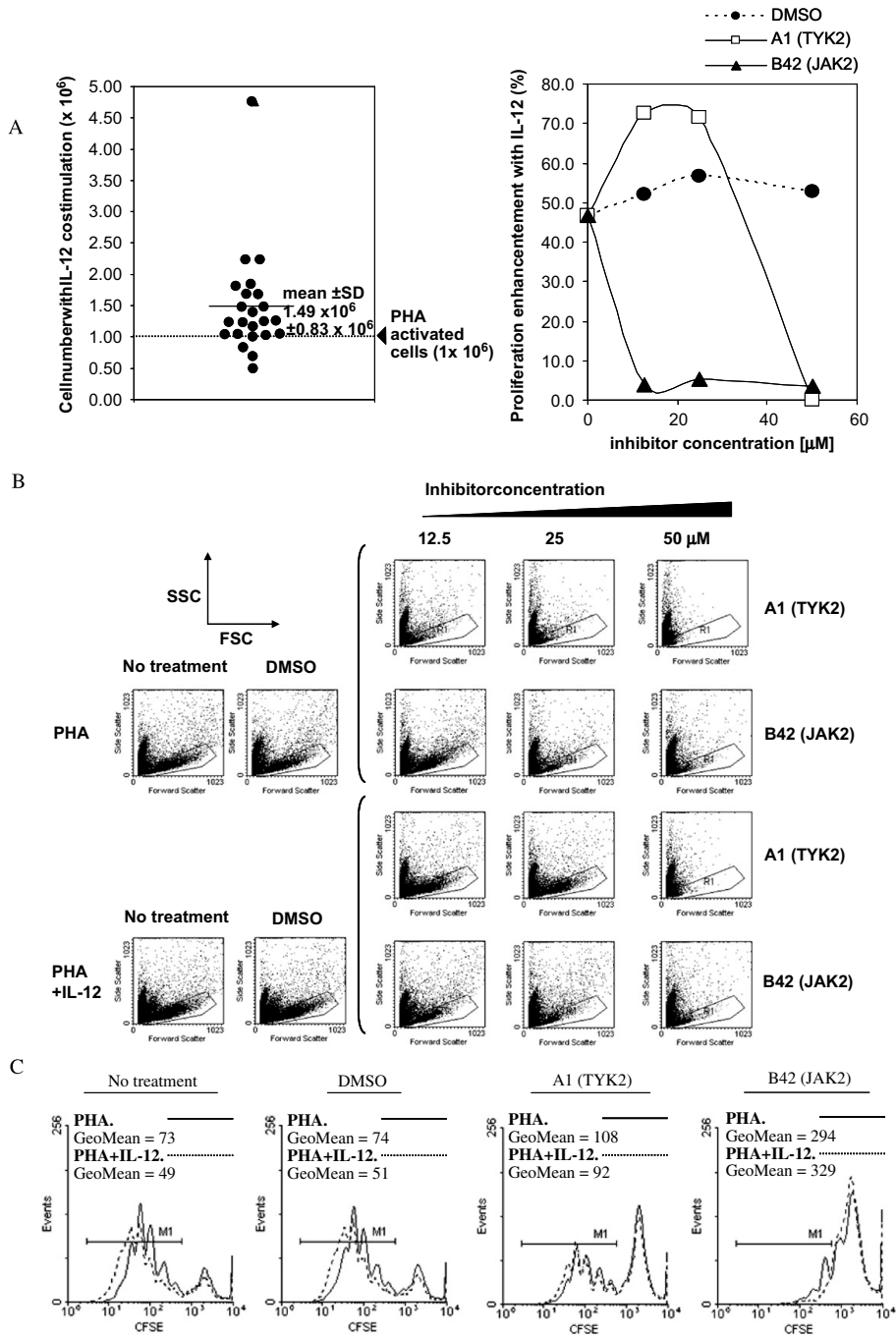
## Results

To study the proliferative signals delivered by IL-12R, we first set up the conditions required to get IL-12R<sup>+</sup> cells (Trinchieri, 2003; Watford et al., 2004). Cell surface expression of both IL-12Rβ1 and β2 proteins was up-regulated upon cell stimulation with the mitogenic lectin PHA (maximum on day 3; not shown), 10–20 µg/ml being the optimal concentration of mitogen (Fig. 1A). The low levels of both receptors led us to undertake a donor-to-donor variability study, which yielded a highly individual response (Fig. 1B) that compelled us to select only those individuals clearly IL-12R<sup>+</sup> for subsequent experiments. Due to the high concentration of mitogen required we also assessed cell viability, it being evident that 10 µg/ml PHA significantly induced cell damage (data not shown). This forced us to work in some experiments (e.g. proliferation assays) with suboptimal amounts of lectin, which allowed enough IL-12R expression with a high cell viability. Moreover, culture conditions had also to be established to determine the proliferation rates of T lymphocytes. PBMCs were CFSE-labelled, seeded at various densities and activated for 5 days with different concentrations of PHA



**Fig. 1.** PHA increases IL-12R levels in a dose- and donor-dependent manner. (A) Human PBMCs were cultured for 3 days with different amounts of PHA and the expression of both IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 proteins was analyzed by flow cytometry. Results come from one representative experiment out of three. (B) Donor-to-donor variability study. IL-12Rβ1 and β2 proteins were detected by flow cytometry on PBMCs from different donors (IL-12Rβ1,  $n = 16$ ; IL-12Rβ2,  $n = 30$ ) cultured for 3 days with 10 μg/ml of PHA. (C) CFSE-stained PBMCs were activated with different amounts of PHA (1.25, 2.5 and 5 μg/ml) at the indicated cell densities. Culture medium was supplemented (■) or not (△) with 2 ng/ml IL-12 and cell proliferation measured after 5 days by flow cytometry. Rf (y-axis) is the calculated responder frequency (i.e. the percentage of responder T cells that divided at least once).

**Fig. 2.** JAK2 mediates the effect of IL-12 on T cell proliferation. (A) IL-12 enhances the mitogenic activity of PHA through a JAK2-mediated signalling cascade. Left graph: human PBMCs were seeded at  $0.5 \times 10^6$  cells/ml and the number of viable cells calculated after 5–6 days of culture using a Neubauer haemocytometer and trypan blue exclusion criteria. Data represent the rise in the absolute number of cells after PHA (1 μg/ml) + IL-12 (1–2 ng/ml) activation (●) when a final number of  $1 \times 10^6$  PHA-activated cells (1 μg/ml; dashed line) is considered. Differences were found significant at  $p < 0.05$  (one-tailed Student's *t*-test;  $n = 23$  pairs of data). Right graph: data from dose–response experiments with both B42 (JAK2) and A1 (TYK-2) inhibitors. PBMCs were stained with CFSE, seeded at  $0.25 \times 10^6$  cells/ml and cultured for 5 days with 1.25 μg/ml PHA ± 2 ng/ml IL-12. Either DMSO or the same volume of the corresponding inhibitor (A1 or TYK2; final concentration: 12.5, 25 or 50 μM) were also added to the well. The x-axis represents the final inhibitor concentration used, and the y-axis the relative percentage of proliferation enhancement caused by PHA + IL-12 with regard to PHA alone. (B) Forward (FSC) vs. Side (SSC) scatter plots showing the effect of culture medium (no treatment), DMSO, A1 and B42 on cell viability. (C) Characteristic CFSE histograms of PHA- or PHA + IL-12-activated PBMCs after 5 days of *in vitro* culture using medium alone (no treatment), or medium supplemented with DMSO or 25 μM of either A1 or B42 inhibitors. All data presented in this figure (except data in (A), left) are representative of the three experiments performed ( $n = 3$ ).



(<10 µg/ml) ± IL-12. As shown (Fig. 1C), IL-12 enhanced T cell proliferation in a PHA-dose and cell concentration-dependent way (optimum: 1.25 µg/ml PHA and  $0.25 \times 10^6$  cells/ml) and only played a role up-regulating the PHA-induced proliferation when the amount of lectin was low (<2.5 µg/ml).

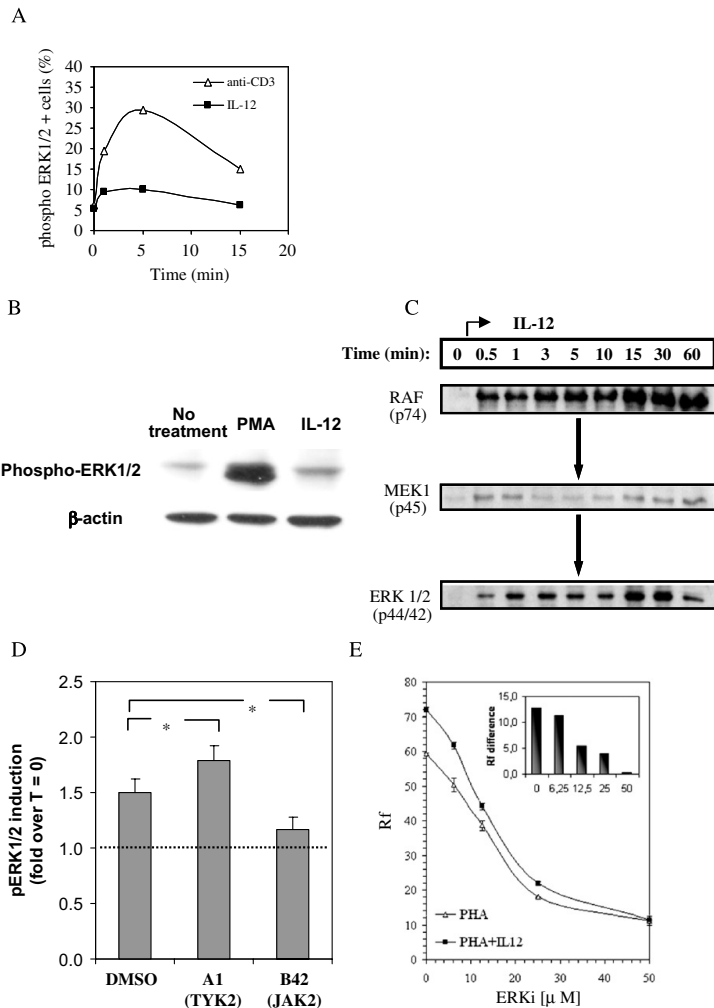
Resting T lymphocytes (IL-12Rβ1<sup>+</sup> but IL-12Rβ2<sup>-</sup> cells) produce IFNγ, although they do not proliferate in response to IL-12. Instead, IL-12 stimulates activated T cells to produce IFNγ, but also enhances their division (Trinchieri, 2003; Watford et al., 2004 and Fig. 2A, left graph, cell-counting experiment). Since IFNγ might be mediating the promitogenic properties of IL-12 in T lymphoblasts (Asao and Fu, 2000) different amounts of a neutralizing anti-IFNγ were used, but no reduction of the IL-12 mitogenic effect was observed (data not shown).

Another feasible explanation for the mitogenic activity of IL-12 was related to the IL-12Rβ2 expression at day 3 upon T cell activation but its total absence in resting T lymphocytes (Trinchieri, 2003; Watford et al., 2004). Since IL-12Rβ2 interacts with JAK2 (Watford et al., 2004), we studied the role of IL-12Rβ2 in IL-12-induced proliferation using CFSE-stained cells and two JAK inhibitors: tyrphostin A1 (TYK2-specific) and tyrphostin B42 (JAK-2-specific). Because unspecific or toxic effects could arise as a result of using excessive amounts of those inhibitors, dose–response experiments were conducted to determine the optimum amount of both reagents. CFSE-stained PBMC were polyclonally activated for 5 days with PHA or PHA + IL-12 in the presence of either DMSO or the specific JAK inhibitor. It was observed that 25 µM of the JAK2-inhibitor B42, but not A1, was able to suppress the enhancement of T cell proliferation caused by IL-12 (Fig. 2A, right graph), while cell viability was still kept at good values (Fig. 2B). Besides, a high concentration (50 µM) of the TYK2-specific inhibitor A1 was also able to suppress the IL-12-effect on the mitogenic rate of T lymphoblasts (Fig. 2A), although at the expense of a high cell mortality (Fig. 2B). Therefore, our findings proved that human IL-12 induced T cell mitogenesis by means of a JAK2-dependent but TYK2/IFNγ-independent mechanism, since only B42 significantly reduced the proliferation triggered by IL-12 (Fig. 2C). On the other hand, it has been found that cytokines, but not the TCR, activate JAK kinases and STAT proteins (Beadling et al., 1994). In spite of that, we observed the *Janus* inhibitor B42 affected severely the proliferation induced by the lectin, probably reflecting that JAK2 (and likely the corresponding signalling route downstream) was being used to channel those signals delivered through the IL-12R but also the TCR/CD3 complex, reinforcing each other. This cross-talk between the TCR and a cytokine receptor through a JAK has already been reported for JAK3 (Tomita et al., 2001).

We then investigated the tyrosine phosphorylation pattern triggered by IL-12 using Western blotting. For this purpose, 3-day PHA blasts were harvested, washed and stimulated with IL-12 for different times, observing an increase in the number of phosphorylated proteins (data not shown). We were curious about the 43 kDa band, because of its similar MW to ERK1/2, so we examined by intracellular flow cytometry the Thr-202/Tyr-204 phosphorylation of ERK1/2. Fig. 3A shows a basal ERK1/2 phosphorylation in 3-day PHA blasts that was enhanced upon TCR cross-linking with anti-CD3 + GAM. More importantly, ERK1/2 activation was also triggered by IL-12 in these cells with similar kinetics (peak around 5 min) to anti-CD3 (Fig. 3A) or PMA (not shown), but with a reduced signal strength. Consequently, we decided to use a more sensitive technique to detect the ERK1/2 phosphorylation. Thus, the BD<sup>TM</sup> CBA Flex Set approach allowed us to assay the phospho-p38, -JNK and -ERK1/2 levels in our cell lysates from PHA blasts stimulated with IL-12 for 5 min. Phospho-p38 and phospho-JNK were analyzed as positive and negative controls, respectively (Watford et al., 2004) and, as expected, IL-12 clearly induced the activation of p38, but not JNK (Table 1). Once again, our data (Table 1 and Fig. 3B; both experiments used the same cell extracts) also supported that IL-12 significantly triggered the phosphorylation of ERK1/2.

To also analyze the events taking place upstream of ERK1/2, we used a Phospho-ERK1/2 Pathway Sampler Kit. PHA blasts were incubated with IL-12 for different times and specific phosphoproteins detected by Western blotting. As can be observed, these experiments yielded a stronger and more sustained ERK1/2 signalling than the flow cytometry assays (Fig. 3C vs. A), which could result from either different technical sensitivities of Western blotting and immunofluorescence or from a fast nuclear translocation of phospho-ERK that made this kinase rapidly undetectable by flow cytometry. In any case, ERK1/2 activation by IL-12 proceeded through the classical Raf-MEK1-ERK1/2 route (Fig. 3C), which gave more support to our previous results. In order to test whether or not JAK2 was acting upstream of ERK1/2 we used flow cytometry assays. As Fig. 3D shows, ERK1/2 activation by means of IL-12 was sensitive to B42, but not to the A1 inhibitor, which suggested that phosphorylation of this MAP kinase was under the control of JAK2. As in proliferation experiments (Fig. 2C), B42 (but not A1) also slightly affected the ERK1/2 phosphorylation induced by the lectin (data not shown), which probably reflected that the transduction routes promoted by the IL-12R and the TCR/CD3 complex shared, somehow, the JAK2 kinase in order to stimulate the ERK1/2 pathway. Then, CFSE-loaded PBMCs were activated for 5 days with PHA ± IL-12 in the presence of different amounts of a cell-permeable ERK inhibitor (ERKi). ERKi blocks the interaction of





**Fig. 3.** IL-12 stimulates cell proliferation through a JAK2-ERK1/2-dependent mechanism. (A–D) PHA blasts (10  $\mu$ g/ml PHA, 3 days) were washed and stimulated for different times with IL-12 (2 ng/ml). (A) Flow cytometry experiment showing the time course of ERK1/2 phosphorylation resulting from the cell stimulation with either anti-CD3 + GAM ( $\Delta$ ) or IL-12 ( $\blacksquare$ ). (B) Three-day PHA blasts were activated (5 min) with PMA or IL-12 and phospho-ERK1/2 levels measured by Western blot (same cell extracts as in Table 1). (C) Cell lysates were analyzed by Western blot with Phospho-ERK1/2 Pathway Sampler Kit. (D) Flow cytometry experiment showing the ERK1/2 phosphorylation in lymphoblasts treated (5 min) with IL-12 in the absence (DMSO) or presence of *Janus* kinase inhibitors (either A1 or B42; 25  $\mu$ M/each). Phosphorylation enhancement was expressed as fold over  $T = 0$  and data presented as mean  $\pm$  SD of triplicate samples. Asterisks (\*) indicate those significant differences at  $p < 0.05$  (Student's *t*-test). (E) CFSE-stained PBMCs were stimulated for 5 days under the same experimental conditions as in Fig. 2 with PHA (black bars) or PHA + IL-12 (white bars). Cultures were supplemented with different amounts of an ERK inhibitor (ERKi). The graph shows the Rf values (mean  $\pm$  SD; see Fig. 1) from samples analyzed in triplicate by flow cytometry. Differences between Rf values from PHA- and PHA + IL-12-stimulated cells are also presented (bars plot inside) to show the continuous reduction of the promitogenic function of IL-12. All results (A–E) are representative of at least three experiments where every condition was tested in triplicate.

ERK1/2 with its substrates, which inhibits both cell proliferation induced by the lectin and, more importantly, the enhancement produced by IL-12 (Fig. 3E).

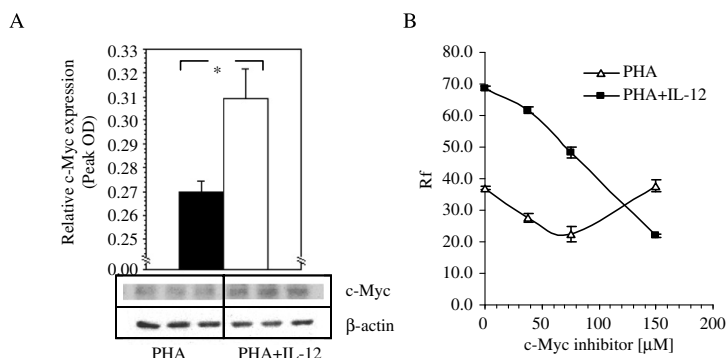
This result, therefore, suggests that ERK1/2, like JAK2, could be important for both TCR- and IL-12-mediated T cell mitogenesis.

**Table 1.** CBA flex set data show that MAPK p38 and ERK1/2, but not JNK, are activated by IL-12

IL-12				PMA
Antibodies specific to	<i>T</i> = 0 min (pg/ml)	<i>T</i> = 5 min (pg/ml)	Fold-increase	Fold-increase
p38	135.23	575.96	4.3	2.7
JNK	11.53	12.71	1.1	1.7
ERK	19.24	251.85	13.1	72.7 <sup>a</sup>

Phospho-p38, -JNK and -ERK1/2 levels were measured by a cytometric bead assay (CBA) in cell lysates from human PHA-lymphoblasts stimulated (*T* = 5 min) or not (*T* = 0 min) with either IL-12 (2 ng/ml) or PMA (200 ng/ml). Data (pg/ml) shown were obtained using MAP kinase CBA standard curves and also expressed as fold-induction with regard *T* = 0 min. The same samples were analyzed by Western blot (Fig. 3B) using identical antibodies.

<sup>a</sup>Above lineal range.



**Fig. 4.** The mitogenic effect of IL-12 on human T cells partly depends on the transcription factor c-Myc. (A) PBMCs were seeded at  $0.25 \times 10^6$  cells/ml and activated for 5 days with either PHA (1.25 μg/ml; black bars) or PHA + IL-12 (2 ng/ml IL-12; white bars). Western blot assays were done to show the higher c-Myc levels in PBMCs stimulated with PHA + IL-12. Antibodies were stripped off the membranes and β-actin levels measured. Peak OD values for c-Myc were obtained by densitometry, relativized to the peak OD values for β-actin and plotted as a bar chart (Y-axis; relative c-Myc expression). Data are presented as the mean ± SD of triplicate samples and differences (\*) were significant at  $p < 0.01$ , as determined by a Student's *t*-test. (B) Dose–response experiment with the c-Myc inhibitor (Z,E)-5-(4-ethylbenzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one showing the effect of blocking the c-Myc/Max interaction on cell proliferation. CFSE-labelled PBMCs were stimulated with PHA (△) or PHA + IL-12 (■) (see Fig. 2 for culture conditions in proliferation experiments) and triplicate samples analyzed by flow cytometry. The responder frequency (Rf) was calculated as in Fig. 1. Error bars represent the SD of triplicate samples ( $n = 3$ ).

c-Myc was a likely candidate to be downstream of ERK1/2 (Sears, 2004). Indeed, slightly increased c-Myc levels were measured by Western blotting in PBMCs cultured for 5 days with PHA + IL-12 as compared with those stimulated exclusively with PHA (Fig. 4A). Besides, when the c-Myc–Max interaction was blocked with a specific inhibitor, both the proliferation generated by the lectin and, specially, the enhancing effect of IL-12, were also eliminated (Fig. 4B). However, although a Ser62/Thr58 phosphorylation of c-Myc was weakly triggered by IL-12, this effect and the up-regulation of the c-Myc protein were not sensitive to ERK1/2- or JAK-2-specific inhibitors (data not shown). Therefore, c-Myc was partially mediating the proliferative effect of IL-12, but this transcription factor was probably not an immediate target of ERK1/2.

## Discussion

In this study, we show new data on the signal pathway linked to the mitogenic activity of IL-12, where IL-12Rβ2, PI3K/Akt (Watford et al., 2004; Yoo et al., 2002) and now the ERK pathway play a role. Different kinases are found associated to IL-12Rβ2, like the cyclin G kinase. However, this kinase does not have detectable effects on cell proliferation (Lin et al., 2007). Our work focuses on another IL-12Rβ2-associated protein, the *Janus* kinase JAK2. As shown in the present paper, JAK2 is relevant for the proliferation of human T lymphocytes in response to IL-12, which agrees with data from the murine system (Sugimoto et al., 2003), but also in response to TCR stimulation, which talks about common signalling routes shared by IL-12R and the

TCR/CD3 complex. However, the signalling machinery triggered downstream of JAK2 is still unknown. Several works have presented contradictory results about the role of ERK1/2 on T cell mitogenesis induced by IL-12 (Pignata et al., 1994; Athie et al., 2000; Visconti et al., 2000). Our results, using different experimental approaches, suggest that IL-12, via JAK2, activates the Raf-MEK1-ERK1/2 route, although at a lesser extent than the signalling through the TCR. Besides, raft disruption with the cholesterol chelating dextrin M $\beta$ CD not only significantly reduces the IL-12R $\beta$ 2 levels in T lymphoblasts, but also blocks the effect of IL-12 on T cell proliferation and ERK1/2 activation (data about to be published), which underlines even more the role of JAK2. A previous paper with similar experimental conditions (human PBMcs, PHA stimulation) (Pignata et al., 1994) and a more recent paper working with NK cells (Kondasula et al., 2008) yielded positive results regarding the role of IL-12 as an activator of ERK1/2. However, other groups did not obtain the same results (Athie et al., 2000; Visconti et al., 2000) and the reason for those divergent data probably reflects the existence of different (and not always optimal) experimental conditions. In any case, since the ERK pathway is also turned on by some growth factors and cytokines (McCubrey et al., 2000), the idea of IL-12 delivering mitogenic stimuli to T cells through the IL-12R $\beta$ 2/JAK2/ERK1/2 pathway which, at the same time, could strengthen the ERK1/2 signals generated via TCR, should not be surprising.

Another issue is to find the transcription factor(s) downstream of ERK1/2. Both Elk-1 and p90-RSK, which control cell proliferation and/or survival, were likely candidates (McCubrey et al., 2000). However, although tested, we did not observe any up-regulation of Elk-1 or p90-RSK phosphorylation upon IL-12 incubation using the phospho-ERK1/2 pathway kit. A role for STAT4 mediating the effect of IL-12 on cell cycle progression has also been suggested (Nishikomori et al., 2002). Nevertheless, STAT4 serine phosphorylation is not regulated by ERK1/2 (Watford et al., 2004) and hence proteins like c-Myc, with increased levels in IL-12-treated murine T lymphocytes, could be important (Sugimoto et al., 2003). In this regard, our data with human T cells confirm and expand these findings. However, differences in c-Myc expression between IL-12-treated vs. non-treated human T lymphoblasts are rather subtle and may not be enough to explain the higher proliferative rates with IL-12.

c-Myc shows a short half-life and multiple phosphorylation sites important for protein stability, c-Myc/Max dimerization or transcriptional activation. Ser-62 is phosphorylated *in vitro* by MAPK (ERK1/2, JNK) and cyclin/CDks, while Thr-58 is subsequently phosphorylated by GSK-3. Besides, c-Myc levels are high in cycling cells (Sears, 2004). However, in spite of IL-12

slightly increasing the Ser-62 phosphorylation of c-Myc, this cytokine is not able to induce any JNK activation (Watford et al., 2004; our CBA data). Besides, inhibition of both ERK1/2 (ERKi) and JAK2 (B42) neither abrogates the Ser-62 phosphorylation of c-Myc nor the up-regulation of c-Myc protein by IL-12 (data not shown). Therefore, our results suggest that IL-12 enhances T cell proliferation through an IL-12R $\beta$ 2-JAK2-ERK1/2-dependent mechanism, although ERK1/2 does not seem to perform the *in vivo* phosphorylation of c-Myc at Ser-62 (Lutterbach and Hann, 1999). Thus, which are the most immediate JAK2 and ERK1/2 targets remains to be elucidated.

## Acknowledgments

We are grateful to Dr. J. Trotter (Scripps Institute, La Jolla, CA), for the WinMDI software, and Centro de Transfusiones de Galicia, for all the buffy coats. This paper was supported by Grants PGIDIT05P-XIB20001PR (Xunta de Galicia) and BFU2006-09717 (Ministerio de Educación y Ciencia). Ana Canda-Sánchez, Amparo Pérez-Díaz and Carla Varela-González were the recipients of a grant from Xunta de Galicia.

## References

- Asao, H., Fu, X.Y., 2000. Interferon-gamma has dual potentials in inhibiting or promoting cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 867–874.
- Athie, M.V., Flotow, H., Hilyard, K.L., Cantrell, D.A., 2000. IL-12 selectively regulates STAT4 via phosphatidylinositol 3-kinase and Ras-independent signal transduction pathways. *Eur. J. Immunol.* 30, 1425–1434.
- Beadling, C., Guschin, D., Witthuhn, B.A., Ziemiecki, A., Ihle, J.N., Kerr, I.M., Cantrell, D.A., 1994. Activation of JAK kinases and STAT proteins by interleukin-2 and interferon  $\alpha$ , but not the T cell antigen receptor, in human T lymphocytes. *EMBO J.* 13, 5605–5615.
- Cordero, O.J., Salgado, F.J., Viñuela, J.E., Nogueira, M., 1997. Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes. *Immunobiology* 197, 522–533.
- Cordero, O.J., Salgado, F.J., Viñuela, J.E., Nogueira, M., 1998. Interleukin-12-dependent activation of human lymphocyte subsets. *Immunol. Lett.* 61, 7–13.
- Kondasula, S.V., Roda, J.M., Parihar, R., Yu, J., Lehman, A., Caligiuri, M.A., Tridandapani, S., Burry, R.W., Carson III, W.E., 2008. Co-localization of the IL-12 receptor and Fc $\gamma$ RIIIa to natural killer cell lipid rafts leads to activation of ERK and enhanced production of interferon- $\gamma$ . *Blood* 111, 4173–4183.
- Lin, Y., Tang, Y.J., Zong, H.L., Gu, J.X., Deng, W.W., Wang, C., Sun, B., 2007. Cyclin G associated kinase interacts with interleukin 12 receptor beta2 and suppresses interleukin 12

- induced IFN $\gamma$  production. *FEBS Lett.* 581, 5151–5157.
- Lutterbach, B., Hann, S.R., 1999. c-Myc transactivation domain-associated kinases: questionable role for map kinases in c-Myc phosphorylation. *J. Cell Biochem.* 72, 483–491.
- McCubrey, J.A., May, W.S., Duronio, V., Mufson, A., 2000. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia* 14, 9–21.
- Nishikomori, R., Usui, T., Wu, C.Y., Morinobu, A., O'Shea, J.J., Strober, W., 2002. Activated STAT4 has an essential role in Th1 differentiation and proliferation that is independent of its role in the maintenance of IL-12R  $\beta$ 2 chain expression and signaling. *J. Immunol.* 169, 4388–4398.
- Pignata, C., Sanghera, J.S., Cossette, L., Pelech, S.L., Ritz, J., 1994. Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation and activation of 44-kD mitogen-activated protein kinase in human T cells. *Blood* 83, 184–190.
- Salgado, F.J., Lojo, J., Alonso-Lebrero, J.L., Lluís, C., Franco, R., Cordero, O.J., Nogueira, M., 2003. A role for interleukin-12 in the regulation of T cell plasma membrane compartmentation. *J. Biol. Chem.* 278, 24849–24857.
- Sears, R.C., 2004. The life cycle of c-Myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle* 3, 1133–1137.
- Sugimoto, N., Nakahira, M., Ahn, H.J., Micallef, M., Hamaoka, T., Kurimoto, M., Fujiwara, H., 2003. Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN $\gamma$  production induced by IL-12 alone or together with IL-18. *Eur. J. Immunol.* 33, 243–251.
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., Glimcher, L.H., 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 713–758.
- Tomita, K., Saijo, K., Yamasaki, S., Iida, T., Nakatsu, F., Arase, H., Ohno, H., Shirasawa, T., Kuriyama, T., O'Shea, J.J., Saito, T., 2001. Cytokine-dependent Jak3 activation upon T cell receptor (TCR) stimulation through direct association of JAK3 and the TCR complex. *J. Biol. Chem.* 276, 25378–25385.
- Trinchieri, G., 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133–146.
- Visconti, R., Gadina, M., Chiariello, M., Chen, E.H., Stancato, L.F., Gutkind, J.S., O'Shea, J.J., 2000. Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood* 96, 1844–1852.
- Watford, W.T., Hissong, B.D., Bream, J.H., Kanno, Y., Muul, L., O'Shea, J.J., 2004. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol. Rev.* 202, 139–156.
- Yoo, J.K., Cho, J.H., Lee, S.W., Sung, Y.C., 2002. IL-12 provides proliferation and survival signals to murine CD4 $^{+}$  T cells through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J. Immunol.* 169, 3637–3643.
- Zhang, M., Moran, M., Round, J., Low, T.A., Patel, V.P., Tomassian, T., Hernandez, J.D., Miceli, M.C., 2005. CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK activation, synaptic raft clustering, and IL-2 production. *J. Immunol.* 174, 1479–1490.

## Differential Distribution of Both IL-12R $\beta$ Chains in the Plasma Membrane of Human T Cells

Ana Canda-Sánchez · Francisco J. Salgado ·  
Amparo Pérez-Díaz · Carla Varela-González ·  
Pilar Arias · Montserrat Nogueira

Received: 30 May 2008 / Accepted: 5 September 2008 / Published online: 9 December 2008  
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

**Abstract** IL-12 is a cytokine that stimulates the expression of CD26, a T cell- and raft-associated ectopeptidase. IL-12 also enhances the interaction between CD26 and CD45RO, which removes the phosphatase CD45RO from raft microdomains. Since Janus kinases are known CD45 substrates, our hypothesis was that this relocation of CD45RO in nonraft areas of the membrane could be important to switch off the signaling via cytokine receptors, e.g., the IL-12 receptor (IL-12R). Accordingly, both IL-12R and CD45RO should be equally positioned in the cell membrane upon IL-12R ligation. However, there were no data available on the membrane distribution of IL-12R on human T cells. Working with phytohemagglutinin (PHA) lymphoblasts, we tried to fill that gap. The high-affinity IL-12R is made of two chains: IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2. Using flow cytometry, Western blot and confocal microscopy, we obtained data suggesting that IL-12R $\beta$ 1 is mainly associated to phospholipid-rich membrane areas, a location even enhanced upon IL-12 incubation of PHA blasts. Instead, IL-12R $\beta$ 2 is found more segregated into membrane rafts, which could explain why two IL-12-triggered events, T-cell proliferation and ERK1/2 activation, are both methyl- $\beta$ -cyclodextrin-sensitive events. Ligation of IL-12R with IL-12 seems to induce a partial enrichment of IL-12R $\beta$ 2 in phospholipid-rich areas, where according to our data IL-12R $\beta$ 1 is already present.

Therefore, although new data will be required, the present results support the initial hypothesis.

**Keywords** IL-12 · IL-12R $\beta$ 1 · IL-12R $\beta$ 2 · Rafts · MAPK · ERK1/2 · Proliferation

### Introduction

Membrane rafts are membrane microdomains enriched in cholesterol and sphingolipids which have gained attention as important sites for signal transduction in a wide variety of cells. Some receptors are either constitutively or inducibly associated to rafts, and some of them are receptors for cytokines (e.g., IL-2R or IL-15R) (Goebel et al. 2002), growth factors (e.g., EGF) (Liu et al. 2007) or biological response modifiers (e.g., prothymosin- $\alpha$ ) (Salgado et al. 2005). The functional IL-12R is made of two glycoproteins, IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 (Presky et al. 1996); but there are no data about the membrane location of both chains in T cells or the role of membrane rafts in cell signaling through IL-12R. This is an interesting issue because IL-12 is a key immunoregulatory cytokine that plays a central role in cell-mediated immune responses (Trinchieri 2003). Among its functions, this cytokine enhances T-cell proliferation, induces the production of proinflammatory cytokines, promotes T<sub>H</sub>1-cell differentiation, upregulates certain proteins (e.g., CD26) and controls their segregation (e.g., CD26 and CD45RO) in different membrane compartments from human T cells (Trinchieri 2003; Cordero et al. 1997; Salgado et al. 2003).

IL-12R $\beta$ 1 is a constitutively expressed protein, but it is also upregulated upon T-cell activation (Wu et al. 1997). In contrast, IL-12R $\beta$ 2 is not present on resting T cells and a T-cell receptor (TCR)-mediated stimulus is required in

A. Canda-Sánchez · F. J. Salgado · A. Pérez-Díaz ·  
C. Varela-González · P. Arias · M. Nogueira (✉)  
Department of Biochemistry and Molecular Biology, CIBUS,  
University of Santiago de Compostela, Lope Gómez de Marzoa  
s/n, 15782 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain  
e-mail: bnlmna@usc.es

order to express this protein (Rogge et al. 1999; Wu et al. 2000). In a murine system, IL-12R $\beta$ 1 is responsible for both low- and high-affinity binding sites, while IL-12R $\beta$ 2 only confers low affinity for IL-12 (Wu et al. 2000). Instead, both human IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 proteins bind IL-12 with low affinity, generating a high-avidity and fully functional receptor when coexpressed (Presky et al. 1996). IL-12R lacks kinase activity, which means that its association with Janus tyrosine kinases (JAKs), TYK2 (IL-12R $\beta$ 1-bound) and JAK2 (IL-12R $\beta$ 2-bound) is required to deliver an intracellular signal (Zou et al. 1997). Upon IL-12 binding, JAKs phosphorylate themselves and, subsequently, phosphorylate the IL-12R $\beta$ 2 cytoplasmic region, providing docking sites for the SH2 domains of STAT proteins (signal transducers and activators of transcription). STAT4 is the main transcription factor activated by IL-12, and its binding to IL-12R $\beta$ 2 is followed by TYK2-dependent tyrosine phosphorylation and the nuclear translocation of STAT4 (Naeger et al. 1999; Sugimoto et al. 2003). STAT4 is additionally phosphorylated in serine by p38, a mitogen-activated protein kinase (MAPK). Double tyrosine/serine phosphorylation of STAT4 is important, together with STAT3 (Sugimoto et al. 2003), for IFN $\gamma$  production and T<sub>H</sub>1 differentiation (Visconti et al. 2000; Morinobu et al. 2002).

As many other cytokine receptors, alternative signaling pathways are triggered through the IL-12R, like the PI3K/Akt kinase (Athié-M et al. 2000) or the MAPK system (Pignata et al. 1994; Visconti et al. 2000; Morinobu et al. 2002). The MAPK family of protein kinases (extracellular signal-regulated kinases [ERKs], c-Jun N-terminal kinases [JNKs] and p38 kinase) are regulated by different stimuli (Mor and Philips 2006). IL-12 induces the activation of 44-kDa MAPK (Pignata et al. 1994) in human phytohemagglutinin (PHA) lymphoblasts, and very recently, ERK1/2 activation has also been shown in human NK cells costimulated with IgG and IL-12 (Kondadasula et al. 2008). However, some authors disagree with these results and exclude ERKs as part of the signal-transduction machinery triggered by IL-12 (Athié-M et al. 2000; Visconti et al. 2000). Membrane rafts (Janes et al. 1999; Viola 2001; Drevot et al. 2002) and ERKs (Mor and Philips 2006) are important to control T-cell proliferation. In this sense, we report that IL-12 induces cell proliferation and ERK1/2 activation. Both events are dependent on membrane raft integrity, which is connected with our findings, suggesting that IL-12R $\beta$ 2, the main IL-12R chain capable of delivering a proliferative signal (Presky et al. 1996; Zou et al. 1997), is a partially raft-associated protein. However, upon IL-12 binding, the initial segregation of both chains changes slightly since IL-12R $\beta$ 2 tends to move out of those microdomains to heterodimerize with IL-12R $\beta$ 1 and form the high-affinity IL-12R.

## Materials and Methods

### Materials

PHA, carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), penicillin/streptomycin solution, RPMI 1640, methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), leupeptin, aprotinin and mouse anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody were all supplied by Sigma (St. Louis, MO). Recombinant human IL-12 was from Peprotech (London, UK). Ficoll Paque<sup>TM</sup> Plus, ECL<sup>Plus</sup> and the Western blotting detection kit were manufactured by GE Healthcare (Waukesha, WI); BCA was from Pierce Biotechnology (Rockford, IL); Super RX film was from Fujifilm (Tokyo, Japan); PVDF membrane was from Millipore (Bedford, MA); the alkaline phosphatase (AP) conjugate substrate kit was from Bio-Rad (Richmond, CA); and Immunofluore mounting medium was from ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA). Rat anti-human IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 antibodies with their corresponding isotypes, biotinylated polyclonal goat anti-rat Ig, phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD71 (clone M-A712), FITC-labeled anti-CD59 (clone p282) and FITC-conjugated anti-phospho-ERK1/2 were all from BD Biosciences (San Diego, CA). Streptavidin-PE was from Serotec (Raleigh, NC), and CTB Alexa488, Streptavidin-Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 and DiI (Vybrant<sup>®</sup> CM-DiI/C18) were from Molecular Probes (Eugene, OR). For Western blot experiments, goat anti-human IL-12R $\beta$ 2 extracellular domain (R&D Systems, Minneapolis, MN) and anti-IL-12R $\beta$ 1 (scC-20; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) as well as anti-phospho-ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204, Phospho-ERK1/2 Pathway Sampler Kit; Cell Signaling, Beverly, MA) were used.

### Cell Isolation and Culture

Citrate anticoagulated venous blood samples were donated by healthy adult volunteers, and buffy coats were obtained by Centro de Transfusiones de Galicia (Santiago, Spain) according to institutional guidelines. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from these buffy coats by centrifugation on a Ficoll density gradient. PBMCs were harvested, pelleted, washed and cultured in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 10% [v/v] heat-inactivated FBS) in a humidified incubator under 5% CO<sub>2</sub> (Cordero et al. 1997).

### Extracellular Protein Labeling for Flow Cytometry and Confocal Microscopy

Resting T cells lack IL-12R $\beta$ 2 and require TCR stimulation to express this protein (Watford et al. 2004). Therefore, in order

to detect both IL-12R chains by flow cytometry, human PBMCs were first activated for 3 days with PHA (10  $\mu$ g/ml, PHA lymphoblasts). These cells were then washed, fixed with ice-cold 1% PFA-PBS (pH 7.4) at room temperature (RT, 5 min) and placed in PBS–1% BSA–0.05% sodium azide. Fc receptors were blocked (30 min, 4°C) with human IgG, and cells were incubated (1 h, 4°C) with primary antibody (rat anti-IL-12R $\beta$ 1, anti-IL-12R $\beta$ 2 or isotype-matched unspecific antibody) afterward. Lymphoblasts were washed twice with PBS-BSA, incubated (1 h, 4°C) with biotinylated goat anti-rat Ig, washed again and stained using PE-conjugated streptavidin (1 h, 4°C). Finally, cells were washed before sample acquisition in a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences). To detect surface GM1, CD71 and CD59 levels, AlexaFluor 488 cholera toxin B subunit (CTB AlexaFluor488), anti-CD71-PE, anti-CD59-FITC or proper isotypes were used. When necessary, membrane cholesterol depletion was carried out with M $\beta$ CD (2.5 mM) for 15 min at 37°C. Non-ionic detergent-sensitive areas were removed with 0.25% (v/v) TX-100 (5 min on ice) before fixation. Data analysis was performed with WinMDI software ([www.methods.info/software/flow/winmdi.html](http://www.methods.info/software/flow/winmdi.html)).

For confocal microscopy experiments, all incubations were performed at 37°C (1 h). Due to the high IL-12R expression variability between different donors, 3-day PHA lymphoblasts were generated as above and flow-cytometric experiments were first conducted to select only those cells with the highest IL-12R $\beta$ 2 levels. Alexa 633-conjugated streptavidin was used instead of PE-conjugated streptavidin for IL-12R $\beta$ 1 or IL-12R $\beta$ 2 indirect staining. In order to compare the membrane distribution of rafts (GM1-enriched domains) with the localization of every IL-12R chain, cells were costained with CTB AlexaFluor488. Instead, other PHA blasts were stained, before cell fixation and IL-12R labeling, with the PFA-resistant lipid probe DiI (Vybrant CM-DiI/C18) (Bacia et al. 2004) to reveal glycerophospholipid-rich membrane regions (nonrafts). After a final washing step, cells were attached to microscope slides and mounted using Immunofluore antifade medium. Slides were sealed and analyzed using a spectral confocal microscope (TCS-SP2; Leica Microsystems, Barcelona, Spain). Colocalization analysis was performed by means of confocal software.

#### CFSE-Based Proliferation Assays

Human PBMCs were resuspended in RPMI 1640 at  $10 \times 10^6$  cell/ml and incubated with 5  $\mu$ M CFSE for 8 min at RT in the dark. FBS was added to cells to stop the reaction. After washing with complete medium, PBMCs were seeded in a 24-well plate at  $0.25 \times 10^6$  cells/ml, activated with 1.25  $\mu$ g/ml PHA  $\pm$  IL-12 (2 ng/ml) and culture medium supplemented or not with 0.5 mM M $\beta$ CD. CFSE fluorescence decay was measured by flow cytometry after 5 days.

#### Intracellular Immunofluorescent Phospho-ERK Staining

To detect phospho-ERK, 3-day PHA blasts were resuspended in RPMI. After 10 min at 37°C, an aliquot of cells ( $T = 0$  min) was collected and fixed in 4% PFA-PBS (10 min, RT). IL-12 (2 ng/ml) was then added for 5 min at 37°C to the remaining cells. Then, lymphoblasts were collected and either fixed with ice-cold 1% PFA-PBS (pH 7.4) at RT (5 min) or used in Western blot experiments. For intracellular phospho-ERK immunostaining,  $1 \times 10^6$  cells were placed in each test tube, washed (PBS pH 7.4) and permeabilized (90% methanol,  $-20^\circ\text{C}$ , 30 min on ice). Lymphoblasts were then washed twice with PBS–2% FBS–0.05% sodium azide and their FcR blocked with human IgG (30 min, 4°C). Staining was performed with AlexaFluor 488-conjugated antibodies, either anti-phospho-ERK1/2 or the corresponding isotype antibody, in the dark (1 h, RT). After washing, cells were placed in 1 ml of PBS-BSA.

#### TX-100-Resistant Microdomain (Raft) Isolation by Equilibrium Density Gradient Centrifugation

Unless otherwise indicated, all steps were performed at 4°C and according to Ilangumaran et al. (1996). PHA blasts ( $50 \times 10^6$ ) were sequentially washed with PBS (pH 7.4) and TKM buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM EDTA) to eliminate residual serum proteins. Cell lysis was induced upon incubation (20 min on ice) with TKM buffer supplemented with 0.5% TX-100 (v/v) and a protease inhibitor cocktail (1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml leupeptin and 5  $\mu$ g/ml aprotinin). Cell extracts were then adjusted to 40% (w/v) sucrose, placed into SW55Ti tubes (L8-M; Beckman, Fullerton, CA) and overlaid with two solutions made of 36% (w/v) and 5% (w/v) sucrose in TKM buffer. After ultracentrifugation ( $200,000 \times g$ , 18 h, 4°C), 11 fractions (numbered 1–11 from top to bottom, 450  $\mu$ l/each) were harvested. Rafts (fractions 3–6) were pooled separately from nonrafts (fractions 10, 11), and all samples were stored afterward at  $-20^\circ\text{C}$ . The quality of raft microdomain separation was assayed by either AP activity or CD71 protein detection (dot blot assays).

#### SDS-PAGE and Western Blotting

For these experiments, 3-day PHA blasts were stimulated or not for 5 min with IL-12 and treated as described in “Results.” IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 proteins were detected in both pooled raft and nonraft fractions from sucrose gradients (see above) as well as postnuclear lysates. To obtain postnuclear lysates, PHA blasts were placed in RIPA buffer

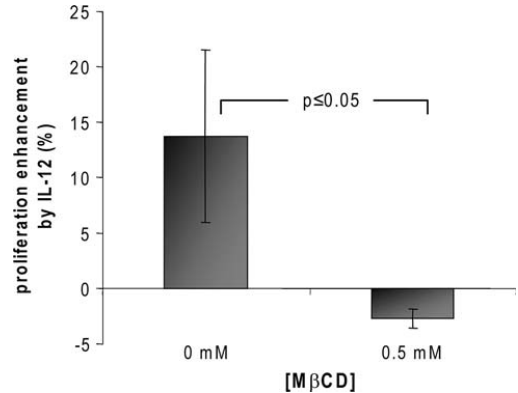
(1× PBS [pH 7.4], 1% [v/v] NP-40, 0.5% [w/v] sodium deoxycholate, 0.1% [w/v] SDS) supplemented with protease inhibitors for 60 min on ice. Samples were then centrifuged at  $13,000 \times g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ). The amount of protein was calculated (BCA) for both raft and nonraft fractions as well as postnuclear lysates, and 5× SDS sample buffer was added to get a final concentration of 200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10% (w/v) glycerol, 3% (w/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1% (w/v) bromophenol blue and 0.1% (w/v) pycronine. In order to detect phospho-ERK, PHA lymphoblasts were stimulated (see “Intracellular Immunofluorescent Phospho-ERK Staining,” above) and aliquots of  $1.5 \times 10^6$  lymphoblasts were lysed in an equal volume of 2× SDS sample buffer. All samples were boiled for 5 min and their DNA content was broken with a syringe.

Proteins (10–15  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ) were separated on an SDS-PAGE gel, transferred to a PVDF membrane and blocked with either 10% (w/v) semifat dry milk in TBS-T (20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) or, to detect phospho-ERK, 1% (w/v) BSA-TBS-T. Blots were incubated with goat anti-human IL-12R $\beta$ 2, anti-IL-12R $\beta$ 1 or anti-phospho-ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204) in blocking buffer and washed with TBS-T; and a suited horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was used. Visualization was performed by the ECL<sup>plus</sup> method. When necessary (e.g.,  $\beta$ -actin measurements), antibodies were stripped off in 0.2 N NaOH (15 min, RT) and the membranes blocked before reprobing.

## Results

### Disruption of Membrane Rafts with M $\beta$ CD Affects T-Lymphocyte Proliferation Enhancement Induced by IL-12 Costimulation

Cholesterol-rich plasma membrane microdomains (rafts) function as specialized signaling platforms in immune cells (Janes et al. 1999; Viola 2001; Drevot et al. 2002). Some cytokine and growth factor receptors are associated to these membrane rafts in a constitutive or inducible fashion (Marmor and Julius 2001; Matkó and Szöllösi 2002; Goebel et al. 2002; Liu et al. 2007). IL-12 is a cytokine with various effects on T lymphocytes (Trinchieri 2003). For example, this cytokine enhances T-cell proliferation induced by the mitogenic lectin PHA, but the effect is dependent on the PHA dose and the initial cell concentration; indeed, this cytokine only behaves as a mitogenic factor when suboptimal amounts of PHA ( $<2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) are used (Canda-Sánchez et al. 2008). To determine whether membrane raft microdomains are required for the proliferative function of IL-12, human PBMCs were labeled with CFSE and activated (initial density  $0.25 \times 10^6$  cells/ml) for 5 days with



**Fig. 1** Cholesterol depletion with M $\beta$ CD leads to suppression of the mitogenic activity of IL-12. Human PBMCs were purified, seeded at  $0.25 \times 10^6$  cells/ml and activated with PHA ( $1.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ )  $\pm$  IL-12 (2 ng/ml); and the culture medium was supplemented (or not) with 0.5 mM M $\beta$ CD to reduce cholesterol levels within the plasma membrane. After 5 days, cells were harvested and CFSE fluorescence was measured by flow cytometry. Proliferation enhancement caused by IL-12 was expressed as a percentage (y axis) over the control (PHA alone). Data (mean  $\pm$  SD) summarize the results from three independent experiments (three donors) where every culture condition was tested at least three times

PHA ( $1.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), with or without IL-12 (2 ng/ml). Cells were also treated (or not) with M $\beta$ CD (0.5 mM), a molecule that disrupts raft structure after extracting cholesterol from the cell membrane (Ilangumaran and Hoessli 1998), and CFSE fluorescence was analyzed by flow cytometry after 5 days of culture. As expected, Fig. 1 shows that IL-12 strengthens cell proliferation induced by PHA; but our results also indicated that this enhancing effect of IL-12 was significantly attenuated when M $\beta$ CD was present. Since IL-12R $\beta$ 2 (Presky et al. 1996; Heath et al. 2000; Jones et al. 2003) and its associated JAK-2 (Sugimoto et al. 2003) have been linked to the proliferative activity of IL-12, we hypothesized that at least one out of two IL-12R chains, the IL-12R $\beta$ 2 protein, could be an M $\beta$ CD-sensitive, and therefore raft-associated, protein.

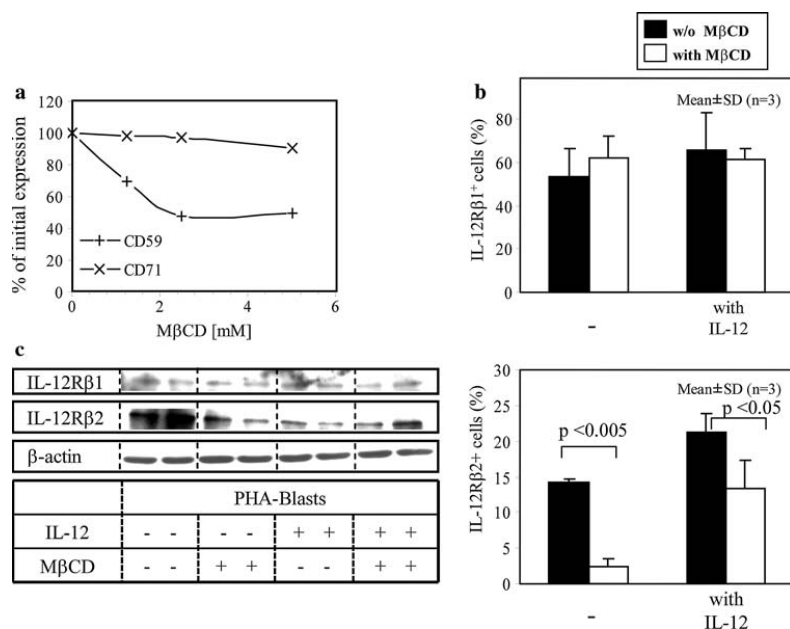
### M $\beta$ CD Significantly Reduces the Expression of IL-12R $\beta$ 2, but not IL-12R $\beta$ 1, in Human T Lymphoblasts

Although there is a growing amount of data regarding the cell membrane distribution of cytokine receptors, there is only one study on IL-12R (Kondadasula et al. 2008) and none undertaking that study in T cells with antibodies specific for both IL-12R chains: IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2. In order to examine the localization of IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 in T cells, human PHA lymphoblasts (PBMCs activated for 3 days with  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  PHA) were generated



using activation conditions previously set up by our group to get a good IL-12R $\beta$ 1/IL-12R $\beta$ 2 expression. After M $\beta$ CD treatment, raft-associated proteins not only move from rafts to nonraft membrane regions but also are internalized, degraded or extracted from the membrane and released into the medium. Therefore, if a protein is found associated with membrane rafts, cholesterol depletion with M $\beta$ CD will probably alter its expression on the cell surface (Ilanguvaran and Hoessli 1998; Goebel et al. 2002; Salgado et al. 2003; Borroni et al. 2007). Initial dose–response assays with M $\beta$ CD were carried out, and the expression of two raft and likely M $\beta$ CD-sensitive markers, CD59 and GM1 (detected with CTB AlexaFluor488) (Ilanguvaran and Hoessli 1998; Matkó and Szöllösi 2002; Rao et al. 2004), and a nonraft and probably M $\beta$ CD-resistant protein, CD71 (Harder et al. 1998; Salgado et al. 2005; Babychuk and Draeger 2006), was measured by flow cytometry. In those experiments it was observed that a single dose of M $\beta$ CD (2.5 mM) eliminated cholesterol without damaging membrane integrity. However, both GM1 (not shown) and

CD59 (Fig. 2a) displayed sensitivity to cholesterol depletion, while the nonraft marker CD71 (Fig. 2a) was resistant to the same concentration of M $\beta$ CD. Bearing these results in mind, we next evaluated the effect of cholesterol depletion on the levels of both IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 proteins, the two chains of the IL-12R. As Fig. 2b shows, a 2.5 mM concentration of M $\beta$ CD significantly downmodulated IL-12R $\beta$ 2 expression in human PHA lymphoblasts, while IL-12R $\beta$ 1 levels remained unaffected. Therefore, these results underline a differential recruitment of both IL-12R proteins in membrane rafts. Thus, the IL-12R $\beta$ 1 chain was closer to CD71-enriched and M $\beta$ CD-insensitive areas of the membrane (nonrafts), while the  $\beta$ 2 chain was more associated to CD59/GM1-enriched and M $\beta$ CD-sensitive domains (rafts). Since ligand interaction could modify the membrane positioning of both proteins, we carried out the same experiments with PHA blasts preincubated for 5 min with IL-12. We found that receptor ligation made IL-12R $\beta$ 2 less sensitive to cholesterol extraction but did not affect the detection of IL-12R $\beta$ 1 (Fig. 2b).



**Fig. 2** Cholesterol extraction with M $\beta$ CD differentially affects the expression of IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2. **a** PBMCs activated for 3 days with 10  $\mu$ g/ml PHA (PHA lymphoblasts) were treated with different concentrations of M $\beta$ CD (15 min, 37°C). Expression of both CD59 (a raft marker) and CD71 (a nonraft marker) proteins was evaluated by flow cytometry with anti-CD59-FITC and anti-CD71-PE monoclonal antibodies, respectively. All data were relativized considering the highest value (without M $\beta$ CD) as 100%. The experiment was repeated three times with similar results. **b**, **c** PHA lymphoblasts

were incubated (or not) with 2 ng/ml IL-12 for 5 min and plasma membrane cholesterol was depleted (or not) with M $\beta$ CD (2.5 mM, 15 min, 37°C). Reduction of IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 expression due to M $\beta$ CD was measured by either flow cytometry (**b**, percentage of positive cells represents the mean for three independent experiments  $\pm$  SD) or Western blotting (**c**, duplicated samples). In **c** constitutive  $\beta$ -actin expression was measured as a protein loading control

Similar results were obtained when PHA lymphoblasts were preincubated or not for 5 min with IL-12, treated or not with M $\beta$ CD and postnuclear lysates separated by gel electrophoresis, transferred to a PVDF membrane and probed for both IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 proteins. As shown (Fig. 2c), IL-12R $\beta$ 2 was downmodulated following cholesterol depletion. Besides, IL-12 preincubation significantly reduced the amount of IL-12R $\beta$ 2 in the lysates, probably due to receptor internalization, but also made IL-12R $\beta$ 2 more resistant to the M $\beta$ CD treatment (Fig. 1c). However, whatever the cell type (lymphoblasts preincubated or not with IL-12), no modification was observed for IL-12R $\beta$ 1 protein levels following cholesterol depletion with M $\beta$ CD. Therefore, as a whole, our findings support the idea that IL-12R $\beta$ 2 could be repositioned from membrane rafts to nonrafts after ligand engagement. In contrast, the same data predict that IL-12R $\beta$ 1 accumulates within nonraft regions after receptor ligation.

#### TX-100 Differentially Reduces IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 Levels in Human T Lymphoblasts

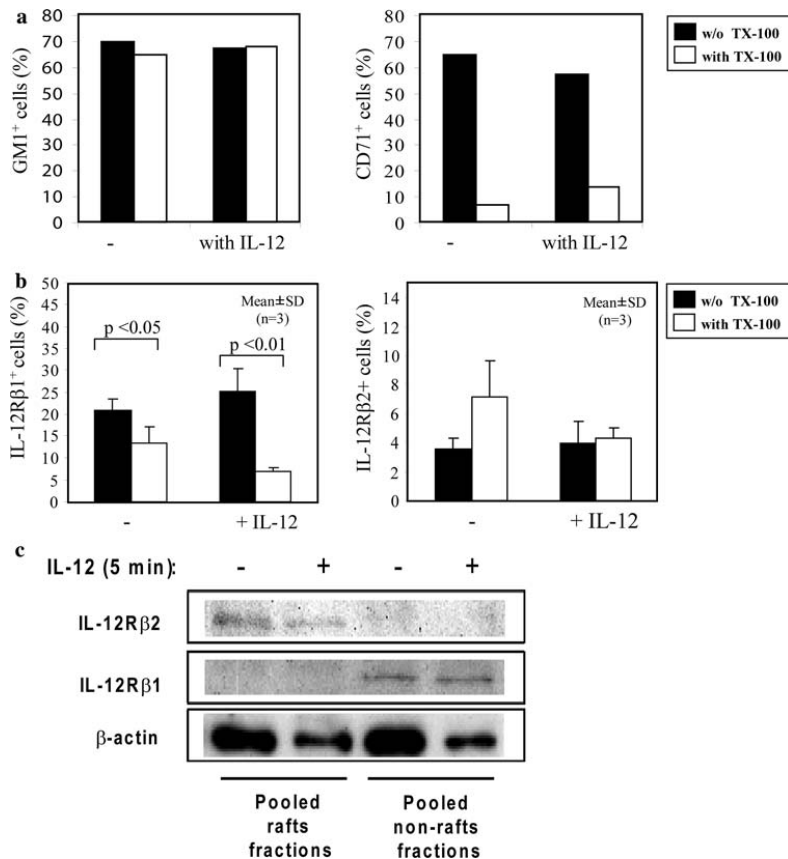
Membrane rafts are microdomains highly resistant at low temperature to non-ionic detergents such as TX-100 (Ilangumaran and Hoessli 1998; Babychuk and Draeger 2006; Salgado et al. 2003, 2005; Peng et al. 2007). To study the presence of certain proteins in membrane rafts, we first tested by flow cytometry the TX-100 sensitivity of CD71 (positive control, nonraft marker) and ganglioside GM1 (negative control, raft marker) (Fig. 3a). Therefore, PHA lymphoblasts were treated with a low TX-100 concentration (0.25% v/v, 5 min, 4°C) which was enough to fully remove CD71 (TX-100-sensitive), but not GM1 (TX-100-resistant), from cells (Peng et al. 2007; Salgado et al. 2005). Then, we examined the effect of TX-100 treatment on the expression of both IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 (Fig. 3b). IL-12R $\beta$ 1 expression was affected by lipid extraction with TX-100 in a similar way to the nonraft and TX-100-sensitive marker CD71. Moreover, the sensitivity of IL-12R $\beta$ 1 to TX-100 was further increased when PHA lymphoblasts were exposed to IL-12 for just 5 min prior to detergent addition, which could be explained considering an enrichment of IL-12R $\beta$ 1 out of membrane rafts caused by IL-12. However, IL-12R $\beta$ 2, in a similar way to GM1, was not downmodulated by TX-100 (Fig. 3b), probably indicating a strong association of IL-12R $\beta$ 2 with membrane rafts. We could not draw conclusions about the influence of IL-12 on the IL-12R $\beta$ 2 location based exclusively on these TX-100 experiments.

Considering our M $\beta$ CD data, we had some indications that IL-12R $\beta$ 2 was associated to membrane rafts and that, once IL-12R engagement took place, the IL-12R $\beta$ 2 chain was rather associated to phospholipids-rich areas (nonrafts)

together with the IL-12R $\beta$ 1 protein to form the high-affinity receptor. In order to give more support to those preliminary data, additional experiments were carried out. Membrane rafts have been traditionally evaluated through biochemical techniques based on the insolubility of these microdomains in non-ionic detergents at low temperatures and their density when submitted to a discontinuous sucrose gradient (Marmor and Julius 2001; Salgado et al. 2003, 2005; Babychuk and Draeger 2006). Three-day PHA blasts were treated with a lysis buffer containing TX-100 and rafts (fractions 3–6) and nonrafts (fractions 9, 10) collected and pooled after ultracentrifugation. The localization of certain markers (AP, CD59 and CD71) (Salgado et al. 2003, 2005) was assessed to evaluate the quality of membrane raft purification, and Western blotting experiments were conducted to detect both IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 in those membrane fractions. IL-12 $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 were present in high-density (nonraft) and low-density (raft) fractions, respectively (Fig. 3c). However, we could not see a clear attenuation of the IL-12R $\beta$ 2 association with membrane rafts after IL-12 stimulation.

#### Quantitation of the Membrane Distribution of Both IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 Chains by Confocal Microscopy

It has been described that the use of detergents could present some limitations and generate artificial associations between surface proteins and membrane microdomains (Magee and Parmryd 2003). To exclude any possible detergent interference, we used confocal microscopy to assess the localization of both IL-12R chains on the plasma membrane of human T lymphoblasts. Two fluorescent molecules, CTB AlexaFluor488 and CM-DiI (Vybrant CM-DiI/C18), were selected to respectively identify raft and nonraft regions on cell membranes. As described above, CTB is a proven raft marker due to its specificity for GM1 (Rao et al. 2004; Salgado et al. 2005), while CM-DiI is a lipid probe which intercalates between phospholipids and labels nonraft membrane regions (Bacia et al. 2004). As expected, fluorescent signals from CTB AlexaFluor488 did not overlap with those from CM-DiI molecules in control experiments (Fig. 4a, c), so we next used IL-12R $\beta$ 1- and IL-12R $\beta$ 2-specific antibodies in combination with biotinylated goat anti-rat and Alexa633-conjugated streptavidin to visualize the location of both proteins. As Fig. 4b shows, a heterogeneous (patchy) distribution for IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 was revealed. Then, we investigated the fluorescent signals of both IL-12R chains relative to the fluorescence of either CTB AlexaFluor488 (rafts) or CM-DiI (nonrafts). Although a substantial overlap could be detected in a minor number of cases, in most cells no significant colocalization was observed between IL-12R $\beta$ 1

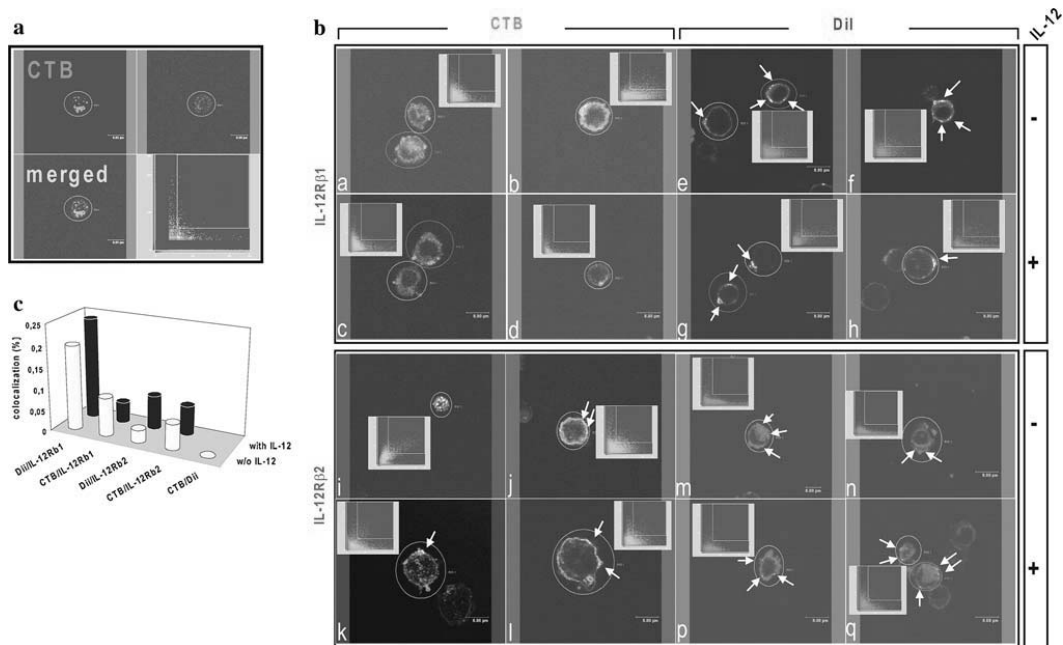


**Fig. 3** IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 show differential sensitivity to the non-ionic detergent TX-100. **a**, **b** PHA lymphoblasts (10 μg/ml, 3 days) were harvested, washed, incubated with or without IL-12 (2 ng/ml, 5 min, 37°C) and exposed to PBS (pH 7.4) containing or not 0.1% (v/v) TX-100 for 5 min on ice. **a** Both ganglioside GM1 (a raft and TX-100-resistant marker; Salgado et al. 2005) and CD71 (a nonraft and TX-100 sensitive marker; Salgado et al. 2003) were detected by flow cytometry with CTB AlexaFluor488 and anti-CD71-PE, respectively. **b** IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 were measured by flow cytometry, and data from three independent experiments were

expressed as mean ± SD. **c** Cell extracts from PHA lymphoblasts, incubated or not with IL-12, were subjected to discontinuous sucrose density gradient ultracentrifugation and 11 fractions, numbered from top to bottom, were collected. Raft (3–6) and nonraft (10, 11) fractions were pooled and AP activity and CD71 protein detected as purity controls (not shown). Then, proteins were separated by SDS-PAGE and IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 were detected with specific antibodies. β-actin expression was also measured as protein loading control. A typical experiment out of three carried out is shown

and CTB (Fig. 4b, c). IL-12 treatment of lymphoblasts for 5 min prior to cell labeling reduced even more the degree of colocalization between IL-12Rβ1 and CTB (Fig. 4b). On the contrary, IL-12Rβ1 showed an extensive colocalization with the nonraft marker CM-DiI, as we can conclude from the white regions in the cell membrane (arrows in Fig. 4b). IL-12 slightly reinforced this colocalization between IL-12Rβ1 and CM-DiI; indeed, a larger and more polarized fluorescence overlap (white areas indicated by arrows in Fig. 4b) was observed after treating lymphoblasts for 5 min with this cytokine. On the other

hand, the persistently low IL-12Rβ2 expression made it very difficult to evaluate the cell membrane distribution. In spite of this setback, we finally observed that IL-12Rβ2 colocalized mainly with the membrane raft marker CTB but barely with the nonraft marker CM-DiI (Fig. 4b). Upon IL-12 treatment of PHA blasts, this situation changed slightly and IL-12Rβ2 showed a small enrichment in DiI-positive areas of the cell membrane (Fig. 4b). Taken together, our results give more support to a model for human T lymphoblasts where IL-12Rβ2, a raft-associated protein, moves out from these membrane microdomains to



**Fig. 4** IL-12R/β2 and IL-12R/β1 preferentially colocalize with raft and nonraft markers, respectively, on human PHA lymphoblasts. PHA lymphoblasts (10 μg/ml PHA, 3 days), treated or not with IL-12 (2 ng/ml, 5 min), were washed, fixed and stained. Ganglioside GM1 expression (raft marker) was revealed using CTB AlexaFluor488 (green). Nonrafts were detected with Vybrant CM-DiI/C18 (red), an unsaturated lipid probe selective for phospholipid-rich areas. The cell membrane distribution of either IL-12R/β1 or IL-12R/β2 proteins (blue) was compared with that of CTB or DiI. The overlapping of CTB and DiI fluorescence was evaluated as a negative control. For each pair of molecules between 84 and 235 cell sections were

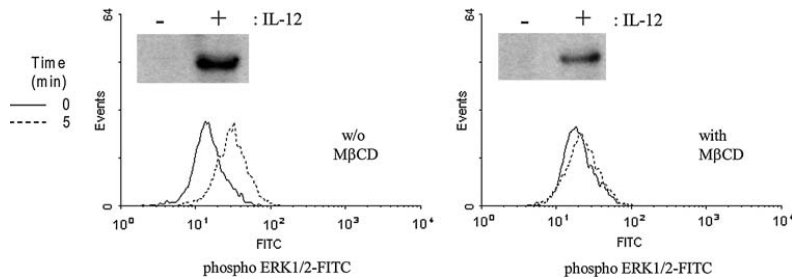
analyzed and the median value (percentage of colocalization) was calculated and plotted (c). Only representative cell sections (two for each condition) are shown in a and b. **a** Absence of colocalization between CTB and DiI markers in PHA blasts. **b** Colocalization analysis of IL-12R/β1 and IL-12R/β2 proteins with either CTB or DiI markers in IL-12-treated or untreated PHA lymphoblasts. For simplicity, only merged images with their respective cytofluorograms are shown. White dots and arrows indicate the presence of colocalizing molecules on the cell surface. Scale bar = 8 μm (refer color images in online)

a new membrane microenvironment (nonrafts), which is enriched in phospholipids (but impoverished in sphingolipids/cholesterol) and where IL-12R/β1 is already present. Once both receptors find each other, the high-affinity IL-12R can arise (Fig. 6).

#### Chemical Disruption of Membrane Rafts with MβCD Attenuates the ERK1/2 Phosphorylation Induced by IL-12

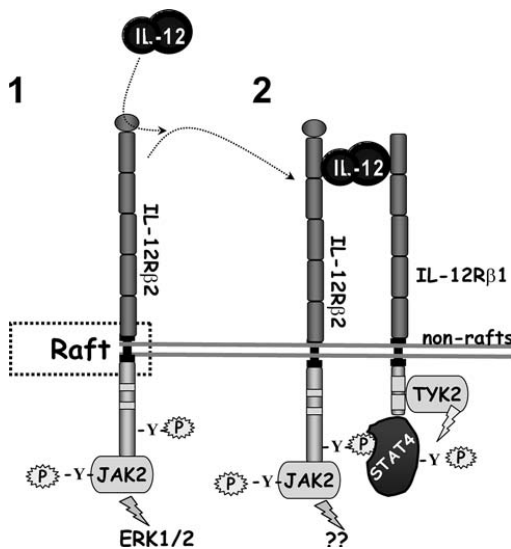
According to our data, IL-12R/β2 is a protein with affinity for membrane rafts. It is known that aggregation of these membrane microdomains with CTB plus anti-CTB antibody triggers signaling pathways similar to those induced by TCR ligation (e.g., ERK pathway activation) (Janes et al. 1999). Therefore, it was likely that IL-12 binding to IL-12R/β2 could generate a similar response. Thus, despite some data that IL-12 does not trigger the Raf–MEK–ERK

pathway (Athié-M et al. 2000; Visconti et al. 2000), we obtained data from different techniques indicating the use of this signaling route by IL-12 (Fig. 5) (Canda-Sanchez et al. 2008). Therefore, ERK1/2 phosphorylation was analyzed as a readout system to examine the role of these sphingolipids and cholesterol-rich microdomains in the IL-12-dependent activation of human T lymphoblasts. These cells were treated or not with 1 mM MβCD at 37°C for 15 min, a concentration which eliminates cholesterol without damaging membrane integrity. After that, cells were stimulated with IL-12, harvested at different times and permeabilized; and levels of phosphorylated ERK1/2 molecules were measured by flow cytometry. In parallel, postnuclear lysates from the same cells were analyzed by Western blot with anti-phospho-ERK1/2 antibodies. As Fig. 5 shows, upregulation of ERK1/2 phosphorylation was evident just after 5 min of incubation with IL-12. Nevertheless, ERK1/2 phosphorylation was not enhanced with



**Fig. 5** ERK1/2 pathway activation is a raft-dependent event important for the mitogenic effect of IL-12. Human PHA blasts (10  $\mu$ g/ml PHA, 3 days), treated or not with 1 mM M $\beta$ CD (37°C, 15 min), were incubated for 5 min with 2 ng/ml IL-12. Cell samples were split in

two and ERK1/2 phosphorylation was evaluated by either flow cytometry or Western blotting. Results are representative of three different experiments



**Fig. 6** Hypothetical model for the location of IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 chains in the plasma membrane of primary human T lymphoblasts. The figure shows our proposed model where IL-12R $\beta$ 2 is initially sequestered in membrane rafts to avoid accidental activation of IL-12R. Ligation of IL-12R $\beta$ 2 in rafts probably leads to ERK1/2 activation, which would reinforce ERK1/2 signaling (and T-cell proliferation) generated by the TCR/CD3 complex in these membrane microdomains. Then, IL-12R $\beta$ 2 is recruited to the phospholipid-rich bulk plasma membrane to give rise, with IL-12R $\beta$ 1, to the high-affinity IL-12R. This step could be important to bring STAT4 (bound to the cytoplasmic side of IL-12R $\beta$ 2) closer to TYK2 (the IL-12R $\beta$ 1-associated Janus kinase) and initiate its tyrosine phosphorylation

regard to background levels when cells were pretreated with M $\beta$ CD (Fig. 5). Based on those data, we can conclude that the mechanism whereby IL-12 promotes ERK1/2 phosphorylation requires raft microdomain integrity and/or IL-12R $\beta$ 2 expression.

## Discussion

Cell membranes are made of a complex mixture of different lipids, like sphingolipids, cholesterol and glycerolphospholipids, which do not distribute uniformly through the entire plasma membrane. Consequently, distinct liquid-ordered phase microdomains (membrane rafts), enriched in cholesterol and glycosphingolipids (e.g., GM1), arise in the plasma membrane of any cell (Magee and Parmryd 2003). Apart from lipids, proteins with glycosylphosphatidylinositol (e.g., CD59) or lipid (myristyl, palmitoyl, farnesyl; e.g., Src kinases) anchors can also be found in membrane rafts (Matkó and Szöllösi 2002), while many transmembrane proteins (e.g., CD71) are excluded or weakly associated with these important signaling platforms (Harder et al. 1998; Babychuk and Draeger 2006). The present study focuses on the connection between membrane rafts and the IL-12R. This receptor is made of two transmembrane proteins, IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2; and several lines of evidence indicate that both proteins are differentially segregated between diverse membrane microdomains from human T lymphoblasts. Thus, before IL-12 stimulation, IL-12R $\beta$ 1 seems to be more associated to glycerolphospholipid-rich areas (nonrafts) of the plasma membrane, while IL-12R $\beta$ 2 is principally detected in raft domains. However, our results also suggest that once IL-12 binding takes place, IL-12R $\beta$ 2 partially translocates to cholesterol-impooverished zones to generate the high-affinity IL-12R together with IL-12R $\beta$ 1 (which is even more enriched in nonrafts upon IL-12 incubation) (Fig. 6).

Very recently, Kondadasula et al. (2008) provided the first data about the membrane distribution of the IL-12R. This report indicated that both FcR $\beta$ IIIa and IL-12R proteins stained diffusely around the cell membrane in resting human NK cells. Besides, signals delivered through either FcR or IL-12R alone did not affect the distribution of IL-12R. However, and according to this author, costimulation

via FcR plus IL-12R made both proteins rapidly colocalize within membrane rafts. The reason for the discrepancy between their observations and our data is unclear, but it could be related to the type of cells used (NK cells versus T lymphoblasts) or the fact that IL-12R colocalization with membrane rafts was mainly observed upon FcR/IL-12R costimulation in NK cells. On the contrary, in our experiments T lymphoblasts were generated first with PHA and then washed and activated with IL-12 alone. Since TCR signaling (e.g., anti-CD3 crosslinking) causes membrane raft coalescence (Janes et al. 1999), we do not know yet how signals through the TCR could influence the cell membrane distribution of IL-12R, especially in combination with IL-12 costimulation. In any case, the comparability of their data with our results is rather limited by the fact that they used a single antibody to detect the whole IL-12R, while in our experiments two antibodies (anti-IL-12R $\beta$ 1 and anti-IL-12R $\beta$ 2) were necessary to reveal the distribution of both IL-12R chains. Clearly, many questions remain to be answered and future studies, using other techniques—like fluorescence resonance energy transfer (FRET), single-particle tracking (SPT), electron microscopy—as well as other molecules—like JAK2, TYK2 and STAT4—will be important to confirm all the data above, reconcile these apparently conflicting findings and shed more light on the fine regulation of this important receptor.

On the other hand, it can be easily inferred that this initial segregation of both  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 chains in different membrane microenvironments may serve as a negative mechanism to control untimely signaling through IL-12R, something that other authors have also pointed out for other cytokine receptors (Goebel et al. 2002; Rao et al. 2004). It is also possible that the initial sequestration of IL-12R $\beta$ 2 in rafts would protect the protein from internalization, while its movement out of rafts to join the IL-12R $\beta$ 1 chain could rather favor its internalization and degradation (Goebel et al. 2002; Rao et al. 2004). However, another plausible explanation could be that membrane rafts play an important role in the process of T-cell activation (Viola 2001; Janes et al. 1999). Thus, IL-12 activates the ERK route (Fig. 5) (Canda-Sánchez et al. 2008; Pignata et al. 1994; Kondadasula et al. 2008) and makes human T lymphoblasts progress through the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle via an IL-12R $\beta$ 2-dependent mechanism (Presky et al. 1996; Heath et al. 2000; Jones et al. 2003). The presence of IL-12R $\beta$ 2 in membrane rafts could be important for the phosphorylation of ERK1/2 and the mitogenic activity of IL-12. In this sense, these cholesterol-enriched microdomains are membrane platforms where important signaling molecules accumulate; some of them, like H-Ras (Niv et al. 2002), play a key role in ERK activation (Anderson 2006). Several findings

support this idea: e.g., membrane cholesterol depletion with M $\beta$ CD triggers the Ras-ERK1/2 pathway (Kabouridis et al. 2000; Wang et al. 2008), while phospho-ERK molecules localize in membrane rafts after a productive TCR signal (Morton et al. 2007). Besides, T-cell proliferation and ERK1/2 phosphorylation induced through the TCR (Xavier et al. 1998) are two events blocked after raft disruption with M $\beta$ CD. Therefore, the description of an association between IL-12R $\beta$ 2 and membrane rafts adds to a growing body of data supporting the connection between these microdomains and the ERK1/2 pathway (Anderson 2006; Mor and Phillips 2006). In agreement with this conclusion, Kondadasula et al. (2008) proposed that signals delivered through the Fc and IL-12 receptors act synergistically to activate ERK; besides, these signals were also blocked by raft disruption with M $\beta$ CD. Moreover, IL-12 is a critical immunoregulatory cytokine that enhances T-cell proliferation (Trinchieri 2003) but only when there are very low levels of TCR occupancy (Canda-Sánchez et al. 2008). Thus, in a similar way as CD28 for naive T cells, IL-12 would provide, through IL-12R $\beta$ 2, a quantitative more than a qualitative signal, amplifying early TCR signaling (e.g., the MAPK cascade) initiated in membrane rafts from effector T cells (Viola 2001).

Finally, dipeptidyl peptidase IV (EC 3.4.14.5) is a transmembrane glycoprotein identical to the leukocyte surface antigen CD26 (Ohnuma et al. 2008). CD26 levels are enhanced on the surface of primary T cells upon TCR triggering, and IL-12 costimulation reinforces that expression (Cordero et al. 1997). The low-molecular weight isoform of the membrane tyrosine phosphatase CD45, CD45RO, interacts with CD26; and according to our working model, IL-12 promotes CD26 expression as part of a shuttling mechanism to gradually exclude CD45RO from rafts and control, at the same time, its tyrosine-phosphatase activity (Salgado et al. 2003). The IL-12R-associated TYK2 and JAK2 kinases are two CD45RO substrates (Irie-Sasaki et al. 2001); therefore, CD45RO could help to turn off the IL-12R as substrate and phosphatase get closer. Since after IL-12 ligation both IL-12R $\beta$ 2 and IL-12R $\beta$ 1 chains tend to be more enriched in nonraft microdomains (just where CD45RO is slowly moving toward because of the IL-12-dependent CD26 upregulation), these new results seem to give more support to our “negative feedback” hypothesis.

**Acknowledgements** We are grateful to Dr. J. Trotter (Scripps Institute, La Jolla, CA) for the WinMDI software and to the Centro de Transfusiones de Galicia for all the buffy coats provided. This study was funded by Xunta de Galicia (PGIDIT05PXIB20001PR) and Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-09717). A. C.-S., A. P.-D. and C. V.-G. were recipients of a grant from Xunta de Galicia.

## References

- Anderson DH (2006) Role of lipids in the MAPK signaling pathway. *Prog Lipid Res* 45:102–119
- Athié-M V, Flotow H, Hilyard KL, Cantrell DA (2000) IL-12 selectively regulates STAT4 via phosphatidylinositol 3-kinase and Ras-independent signal transduction pathways. *Eur J Immunol* 30:1425–1434
- Babiychuk EB, Draeger A (2006) Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach. *Biochem J* 397:407–416
- Bacia K, Scherfeld D, Kahya N, Schwille P (2004) Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophys J* 87:1034–1043
- Borroni V, Baier CJ, Lang T, Bonini I, White MM, Garbus I, Barrantes FJ (2007) Cholesterol depletion activates rapid internalization of submicron-sized acetylcholine receptor domains at the cell membrane. *Mol Membr Biol* 24:1–15
- Canda-Sanchez A, Salgado FJ, Perez-Diaz A, Varela-Gonzalez C, Arias P, Nogueira N (2008) IL-12-dependent activation of ERK1/2 in human T lymphoblasts. *Immunobiology*. doi: 10.1066/j.imbio.2008.07.006
- Cordero OJ, Salgado FJ, Viñuela JE, Nogueira M (1997) Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes. *Immunobiology* 197:522–533
- Drevot P, Langlet C, Guo XJ, Bernard AM, Colard O, Chauvin JP, Lasserre R, He HT (2002) TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of lipid rafts. *EMBO J* 21:1899–1908
- Goebel J, Forrest K, Morford L, Roszman TL (2002) Differential localization of IL-2- and -15 receptor chains in membrane rafts of human T cells. *J Leukoc Biol* 72:199–206
- Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141:929–942
- Heath VL, Showe L, Crain C, Barrat FJ, Trinchieri G, O'Garra A (2000) Cutting edge: ectopic expression of the IL-12 receptor- $\beta$ 2 in developing and committed Th2 cells does not affect the production of IL-4 or induce the production of IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 164:2861–2865
- Ilangumaran S, Arni S, Chicheportiche Y, Briol A, Hoessli DC (1996) Evaluation by dot-immunoassay of the differential distribution of cell surface and intracellular proteins in glycosylphosphatidylinositol-rich plasma membrane domains. *Anal Biochem* 235:49–56
- Ilangumaran S, Hoessli DC (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* 335:433–440
- Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM, Penninger JM (2001) CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409:349–354
- Janes PW, Ley SC, Magee AI (1999) Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* 147:447–461
- Jones ML, Young JM, Huang QR, Puls RL, Webber CA, Benson EM (2003) Interleukin 12-augmented T cell proliferation of peripheral blood mononuclear cells from HIV-seropositive individuals is associated with interleukin 12 receptor beta 2 upregulation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19:283–292
- Kabouridis PS, Janzen J, Magee AL, Ley SC (2000) Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30:954–963
- Kondadasula SV, Roda JM, Parihar R, Yu J, Lehman A, Caligiuri MA, Tridandapani S, Burry RW, Carson WE III (2008) Colocalization of the IL-12 receptor and Fc $\gamma$ IIIa to natural killer cell lipid rafts leads to activation of ERK and enhanced production of interferon- $\gamma$ . *Blood* 111:4173–4183
- Liu Y, Sun R, Wan W, Wang J, Oppenheim JJ, Chen L, Zhang N (2007) The involvement of lipid rafts in epidermal growth factor-induced chemotaxis of breast cancer cells. *Mol Membr Biol* 24:91–101
- Magee AI, Parmryd I (2003) Detergent-resistant membranes and the protein composition of lipid rafts. *Genome Biol* 4:234
- Marmor MD, Julius M (2001) Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Blood* 98:1489–1497
- Matkó J, Szöllösi J (2002) Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio-temporally coordinated? *Immunol Lett* 82:3–15
- Mor A, Philips MR (2006) Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol* 24:771–800
- Morinobu A, Gadina M, Strober W, Visconti R, Fornace A, Montagna C, Feldman GM, Nishikomori R, O'Shea JJ (2002) STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN- $\gamma$  production but not for cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12281–12286
- Morton AM, McManus B, Garside P, Mowat AM, Harnett MM (2007) Inverse Rap1 and phospho-ERK expression discriminate the maintenance phase of tolerance and priming of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 179:8026–8034
- Naeger LK, McKinney J, Salvekar A, Hoey T (1999) Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling. *J Biol Chem* 274:1875–1878
- Niv H, Gutman O, Kloog Y, Henis YI (2002) Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *J Cell Biol* 157:865–872
- Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C (2008) Revisiting and old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol* 29:295–301
- Peng W, Martaresche C, Escande-Beillard N, Cedile O, Reynier-Vigouroux, Boucraut J (2007) Influence of lipid rafts on CD1d presentation by dendritic cells. *Mol Membr Biol* 24:475–484
- Pignata C, Sanghera JS, Cossette L, Pelech SL, Ritz J (1994) Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation and activation of 44-kD mitogen-activated protein kinase in human T cells. *Blood* 83:184–190
- Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK, Gubler U (1996) A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14002–14007
- Rao R, Logan B, Forrest K, Roszman TL, Goebel J (2004) Lipid rafts in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:103–110
- Rogge L, Papi A, Presky DH, Biffi M, Minetti LJ, Miotto D, Agostini C, Semenzato G, Fabbri LM, Sinigaglia F (1999) Antibodies to the IL-12 receptor beta 2 chain mark human Th1 but not Th2 cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 162:3926–3932
- Salgado FJ, Lojo J, Alonso-Lebrero JL, Lluís C, Franco R, Cordero OJ, Nogueira M (2003) A role for interleukin-12 in the regulation of T cell plasma membrane compartmentation. *J Biol Chem* 278:24849–24857
- Salgado FJ, Piñeiro A, Canda-Sanchez A, Lojo J, Nogueira M (2005) Prothymosin  $\alpha$ PHA receptor associates with lipid rafts in PHA stimulated lymphocytes. *Mol Membr Biol* 22:163–176
- Sugimoto N, Nakahira M, Ahn HJ, Micallef M, Hamaoka T, Kurimoto M, Fujiwara H (2003) Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN- $\gamma$  production induced by IL-12 alone or together with IL-18. *Eur J Immunol* 33:243–251

- Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3:133–146
- Viola A (2001) The amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains. *Trends Immunol* 22:322–327
- Visconti R, Gadina M, Chiariello M, Chen EH, Stancato LF, Gutkind JS, O'Shea JJ (2000) Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood* 96:1844–1852
- Wang PY, Weng J, Lee S, Anderson RG (2008) The N terminus controls sterol binding while the C terminus regulates the scaffolding function of OSBP. *J Biol Chem* 283:8034–8045
- Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ (2004) Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev* 202:139–156
- Wu C-Y, Warrier RR, Wang X, Presky DH, Gately MK (1997) Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* 27:147–154
- Wu C-Y, Wang X, Gadina M, O'Shea JJ, Presky DH, Magram J (2000) IL-12 receptor  $\beta 2$  (IL-12R $\beta 2$ )-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *J Immunol* 165:6221–6228
- Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B (1998) Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8:723–732
- Zou J, Presky DH, Wu CY, Gubler U (1997) Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *J Biol Chem* 272:6073–6077